Aus der Kinderklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. J. R. Bierich

Konzentration des cytoplasmatischen Androgenrezeptors in der Prostata der Ratte während der Pubertät

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
KLAUS LANDER
aus Göppingen

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus der Kinderklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. J. R. Bierich

Konzentration des cytoplasmatischen Androgenrezeptors in der Prostata der Ratte während der Pubertät

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
KLAUS LANDER
aus Göppingen

1983

Dekan:	Professor Dr. W. Frommhold
1. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. H. Moeller
2. Berichterstatter:	Professor Dr. D. Gupta
3. Berichterstatter:	Professor Dr. K. Eisele

---

gedruckt bei H.- J. Köhler · Reprografischer Betrieb · Tübingen

Meinen Eltern zu Dank

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Zur Physiologie der Androgenrezeptoren	1
1.2.	Die quantitative Bestimmung des Androgenrezeptors	4
1.3.	Ziel der Arbeit	5
2.	MATERIALIEN	6
2.1.	Radioaktive Verbindung	6
2.2.	Nichtradioaktive Verbindungen	6
2.3.	Geräte	7
2.4.	Tiere	8
3.	METHODEN	9
3.1.	Proteinbestimmung	9
3.2.	DNA-Bestimmung aus dem Homogenat	10
3.3.	Versuchsdurchführung	12
3.3.1.	Pufferlösungen	12
3.3.1.1.	Michaelispuffer	12
3.3.1.2.	Tris-Puffer	12
3.3.1.3.	DTT-Sucrose-Tris-Puffer	12
3.3.2.	Gewinnung und Aufbewahrung der Prostata	12
3.3.3.	Homogenisierung und Suspendierung	13
3.3.4.	Gewinnung des 100 000 g-Überstandes	13
3.3.5.	Bestimmung der Rezeptormenge aus dem 100 000 g-Überstand	13
3.3.5.1.	Inkubation	13
3.3.5.2.	Elektrophorese	14
3.3.5.2.1.	Herstellung von Agarplatten	14
3.3.5.3.	Zusatz von Szintillationsflüssigkeit	16
3.3.6.	Berechnung der Rezeptormenge	16
3.3.7.	Radioaktivitätsmessung	16
3.3.8.	Bestimmung der freien Rezeptormenge	17
3.3.9.	Bestimmung der Steroidkomplexes	17

		Seite
4.	ERGEBNISSE	18
4.1.	Versuchsprotokolle und -werte	18
4.2.	Menge der Prostata pro Tier in mg	32
4.3.	ug lösliches Protein im 100 000 g-Überstand des Prostatahomogenates	34
4.3.1.	ug Protein pro 5 ul 100 000 g-Überstand	34
4.3.2.	Lösliches Protein im 100 000 g-Überstand des Prostatahomogenates bezogen auf ein Tier	36
4.4.	DNA-Konzentration (ug/ml)	38
4.5.	Menge des DNA in ug pro Tier	40
4.6.	Menge DNA in ug bezogen auf 1 g Prostata	52
4.7.	Quotient aus DNA pro Tier/Protein pro Tier	44
4.8.	Supprimierbare Aktivität nach 1 Stunde Inkubation pro 50 ul Inkubat	46
4.9.	Supprimierbare Aktivität nach 48 Stunden Inkubation pro 50 ul Inkubat	48
4.10.	Rezeptor zur Zeit der Suspendierung	51
4.10.1.	Freier Rezeptor zur Zeit t = 0	51
4.10.2.	Steroidrezeptorkomplex zur Zeit t = 0	53
4.11.	Rezeptor zur Zeit der Inkubation	55
4.11.1.	Steroidrezeptorkomplex zur Zeit t = s	55
4.11.2.	Freier Rezeptor zur Zeit t = s	57
4.12.	Supprimierbare Bindung je mg Protein zu den Inkubationszeiten t_1 = 1 Stunde und t_2 = 48 Stunden	59
4.13.	Supprimierbare Bindungen pro Tier zu den Inkubationszeiten t_1 = 1 Stunde und t_2 = 48 Stunden	64
4.14.	^{3}H-R 1881 Bindung pro DNA zu den Inkubationszeiten t_1 und t_2	69
4.15.	Bindung pro mg DNA zu den Zeiten t_0 und t_s	74
4.15.1.	Bindung für den freien Rezeptor	74
4.15.1.1.	zur Zeit t = o	74
4.15.1.2.	zur Zeit t = s	76
4.15.2.	Bindung für den Steroidrezeptorkomplex	78
4.15.2.1.	zur Zeit t = o	78
4.15.2.2.	zur Zeit t = s	80

		Seite
4.16.	fmol ^{3}H-R 1881 pro mg Prostata zu den Inkubationszeiten t_1 und t_2	82
5.	DISKUSSION	87
5.1.	Tiere	87
5.2.	Proteinbestimmung	88
5.3.	DNA-Bestimmung	89
5.4.	Aufbewahrung der Prostata	89
5.5.	Homogenisierung	89
5.6.	Markierung des Rezeptors	90
5.7.	Inkubationszeit und -temperatur	90
5.8.	Abtrennung des markierten Rezeptors	91
5.8.1.	Abtrennung mit Aktivkohle	91
5.8.2.	Fällung mit Ammonsulfat	91
5.8.3.	Zentrifugation im Dichtegradienten	92
5.8.4.	Gelfiltration	92
5.8.5.	Fällung mit Protaminsulfat	93
5.8.6.	Trennung mit Hilfe der Agarelektrophorese	93
5.8.7.	Vergleich der Methoden 5.8.1. - 5.8.6.	94
5.8.8.	Supprimierung der spezifischen Bindung	95
5.8.9.	Bestimmungsmethode	95
5.9.	Umrechnung der supprimierbaren Aktivität nach 1 Stunde bzw. 48 Stunden auf den freien Rezeptor bzw. Steroidrezeptorkomplex zur Zeit der Inkubation und Suspension	96
5.10.	Das Wachstum der Rattenprostata während des untersuchten Zeitraumes	98
5.11.	Zunahme von löslichem Protein im 100 000 g-Überstand und von DNA im Pellet während der Pubertät	98
5.12.	Konzentrationsänderung des ^{3}H-R 1881 Rezeptor-Komplexes während der Pubertät	99
6.	ZUSAMMENFASSUNG	100
7.	ABKÜRZUNGEN	103
8.	LITERATURVERZEICHNIS	104

UNIV. LEIDEN BIOL.

1. EINLEITUNG

1.1. Zur Physiologie der Androgenrezeptoren

Die Wirkung der Hormone wird durch Rezeptoren vermittelt. Es sind Eiweiße, die die Fähigkeit haben, das Hormon spezifisch zu binden und typische chemische Reaktionen in der Zelle auslösen (28). Die Rezeptoren für die Steroidhormone sind im Cytosol lokalisiert.

Bisher ist man der Überzeugung, daß Steroidhormone die Plasmamembran der Zellen in beiden Richtungen passieren können, im Cytosol ihrer Zielorgane aber festgehalten werden (38). Es gibt auch Hinweise darauf, daß spezifisch bindende Proteine an der Passage von Östradiol durch die Plasmamembran beteiligt sind (48), die nicht mit dem cytoplasmatischen Rezeptor identisch sind.

Jungblut u.a. (27) berichten über Experimente zur Physiologie der Rezeptoren. Dabei fanden sich vor allem in den Zellkernen Steroid-Rezeptorenkomplexe. Jungblut u.a. (27) nehmen an, daß der Rezeptor, und nicht das Steroid, das Element ist, welches die Transkription induziert, deren Ausdehnung rezeptor- und zellspezifisch ist. Sie konnten nachweisen, daß die Rezeptoren abgebaut werden, sobald sie gewirkt haben. Weiterhin fanden sie Östradiol-Rezeptoren, deren physikalisch-chemische Eigenschaften Hinweise auf die Entstehungsorte Zytosol, Kerne und mikrosomale Partikel geben. Schon der mikrosomale Rezeptor scheint zur Steroidbindung befähigt. Er enthält auch Strukturen, die für eine Rezeptoraktivierung wichtig sind.

Wie ein Rezeptor aussehen könnte, zeigt folgende schematische Figur (nach Jungblut u.a. (27)).

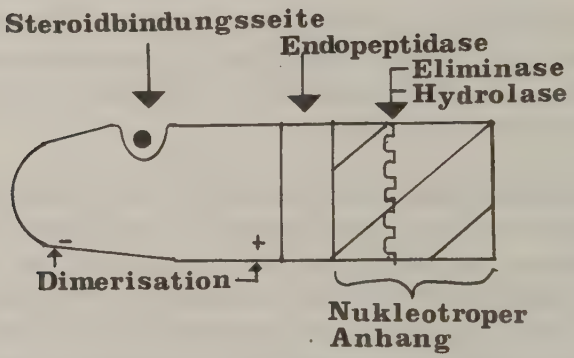


Fig.1: Modell eines Oestradiol-Rezeptors

Bei einem weiteren Versuch wurden die Rezeptoraufnahme in den Kern verfolgt. Dabei fanden sie ein Ansteigen der Kernrezeptorkonzentration bei gleichlaufender Abnahme der Cytosolrezeptorkonzentration. Dieser Vorgang ist irreversibel, d.h., daß ein Rezeptor, der den Kern verläßt, nicht wieder im Cytosol erscheint. Dies weist auf einen unidirektionalen Weg hin, der im Rezeptorabbau endet. Noch ist aber unbekannt, wo dieser Abbau stattfindet. Sicher ist nur, daß nicht der Zellkern die Rezeptoren zu nichtsteroidbindenden Fragmenten abbaut. Ob der Zellkern aber den Rezeptor für einen extranukleären Abbau aufbereitet, bleibt noch zu klären.

Mit Hilfe eines weiteren Versuchs konnten Jungblut u.a. (27) die Behauptung widerlegen, daß das Steroid, aber nicht der Rezeptor frei in den Kern gelangen kann. Dies sei aber kein ausreichender Beweis dafür, daß die Wirkung des Rezeptors steroidunabhängig sei. Um die Rezeptorwirkung vollständig verstehen zu können, müssen noch einige Zwischenstationen des

unidirektionalen Weges aufgeklärt werden. Ebenso muß noch aufgeklärt werden, wie der Rezeptorabbau vonstatten geht. Zudem muß noch die Struktur des nukleotropen Anhangs identifiziert werden, damit auch das Durchdringen der Kernhülle verstanden werden kann. Auch weiß man noch nicht den genauen Wirkungsort des Rezeptors im Kern.

Testosteron wird in der Prostatazelle von 5α-Reduktase unter Mitwirkung von NADPH als Cosubstrat zu 5α-Dihydrotestosteron hydriert und teilweise weiter von der NAD(P)H-abhängigen 3α-Oxyreduktase zu 3α-oder 3β-Androstandiol reduziert (3). Für die Bindung am Rezeptor spielt nur DHT eine Rolle. Die Androstandiole werden gar nicht gebunden und Testosteron im Vergleich mit DHT nur mit 10 % Affinität (35,36).

Der Androgenrezeptor wurde in den ventralen Lappen der Rattenprostata gefunden (19,37,57). Er ist ein saures Glykoprotein, sedimentiert bei 4,5 S und aggregiert bei niedriger Ionenstärke zu 8 S-Addukten. Seine Bindungsfähigkeit verliert er bei Behandlung mit Sulhydryl-Reagenzien und Neuramidase. In vitro ist er äußerst wärmeempfindlich. Es wird vermutet, daß das aktive Molekül phosphoryliert ist (20). In Gegenwart von Pyridoxalphosphat oder Schiff'schen Basen -bildenden Reagenzien verliert der Rezeptor die Fähigkeit, sich an Chromatin oder DNA binden zu können. Daher wird vermutet, daß zur Bindung an das Chromatin freie Aminogruppen erforderlich sind (24). Die Affinität von DHT zum Rezeptor wird von keinem natürlichen Steroid übertroffen. Die Konzentration des Rezeptors ist niedrig: In der Rattenprostata wird die durchschnittliche Bindungskapazität mit 60 fmol/mg cytoplasmatischen Protein angegeben. Etwa 80 % der Androgenrezeptoren einer Zelle sind im Kern lokalisiert und weitgehend mit DHT abgesättigt (7).

Die Konzentration des Androgenrezeptors scheint sich unabhängig von der Androgenkonzentration im Serum zu ändern, wobei aber auch die Androgene die Rezeptorsynthese unabhängig der Konzentration des Androgenrezeptors beeinflussen können. Die Wirkung der Androgene sieht man nach Orchidektomie und im Alter, wenn deren Konzentration im Blut abnimmt und daraufhin auch der Rezeptorgehalt in der Prostata sinkt. Durch eine Androgensubstitution steigt die Rezeptorenkonzentration wieder an (9).

Es gibt aber auch Befunde, die andere regulierende Mechanismen vermuten lassen.

Ein Anstieg des Androgenrezeptors nach Orchidektomie wird nach 8 Tagen gefunden, auch wenn die Tiere ohne Nebenniere und Hypophyse sind (56). In einem anderen Bericht wird aufgezeigt, daß die Rezeptorenkonzentration durch Gabe von Cycloheximid nach der Orchidektomie auf etwa 30 % absinkt (7). Daraus folgt, daß die hohe Konzentration an meßbarem Rezeptor nach der Orchidektomie weitgehend durch Synthese von hormonfreiem Rezeptor bedingt ist.

1.2. Die quantitative Bestimmung des Androgenrezeptors

Man kann den Rezeptor im Gewebehomogenat oder in Zellfraktionen mit einem radioaktiven Liganden markieren. Dann wird die Radioaktivität des in vitro gebildeten Hormon-Rezeptorkomplexes gemessen. Die Schwierigkeiten dieser Methode bestehen darin, den Rezeptor quantitativ zu markieren und dann vor der Messung der Radioaktivität von ungebundenen und unspezifisch gebundenen Liganden abzutrennen, über die verschiedenen Methoden wird noch berichtet (siehe 5.8.).

Bonne und Raynaud (10,11) führten Methyltrienolon (R 1881) als markierenden Liganden ein. R 1881 ist ein Östratrienderivat, das von Velluz u.a. (58) synthetisiert und als stark wirksames Androgen beschrieben worden ist. Es wird im Inkubationsansatz weder verstoffwechselt noch von SHBG gebunden. Der Bindung an SHBG muß bei Arbeiten mit Rattenprostaten keine Rolle beigemessen werden, da SHBG in der Rattenprostata nicht vorhanden ist. R 1881 bindet an Progestinrezeptoren (1,14,17,18,22,41,54,55). Bei Arbeiten mit Rattenprostaten muß man auf diese Störung nicht achten, da sie keine Progestinrezeptoren enthalten.

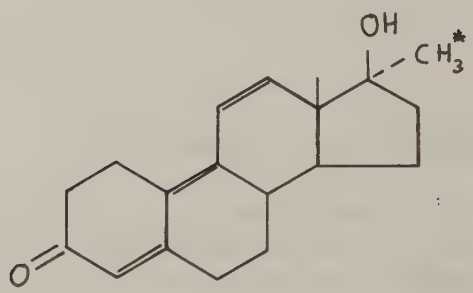
1.3. Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Messung einiger Parameter während der Pubertät der Ratte im Abstand von 5 Tagen. Es wurden die Androgenrezeptorkonzentrationen, das Prostatagewicht pro Tier, die DNA- und Proteinkonzentration pro Tier bzw. pro mg Prostata gemessen und eine Abhängigkeit zur Pubertät aufgezeigt.

2. MATERIALIEN

2.1. Radioaktive Verbindung

^{3}H-R 1881
(17α-methyl-^{3}H-) Methyltrienolon



Spezifische Reinheit größer als 98,5 %
Spezifische Radioaktivität 87 Ci/mmol (= 3219 GBq/mmol);
in 10 ul sind 0,01 mCi (= 0,4 MBq) enthalten.
- Fa. New England Nuclear, Boston, USA

2.2. Nichtradioaktive Verbindungen

(Soweit nicht anders angegeben sind diese Chemikalien Produkte der Fa. Merck, Darmstadt und besitzen einen Reinheitsgrad von mindestens 98 %)

- Acetaldehyd zur Synthese; C_2H_4O; Fa. Merck-Schuchardt;
- Agar purum; Fa. Behring
- Agarosel; Fa. Behring
- Ameisensäure 98 - 100 % p.a.; HCOOH;

- Amidoschwarz 10 B;
- Desoxyribose für biochemische Zwecke;
- 5,5-Diäthylbarbitursäure Natriumsalz, Puffersubstanz-Barbital-Natrium; $C_8H_{11}N_2NaO_3$;
- Diphenylamin p.a.; $(C_6H_5)_2NH$; Fa. Riedel-de Häen AG, Seelze;
- DL-Dithiothreitol (Cleland's Reagent); Reinheitsgrad Sigma Grade; Fa. Sigma Chemical Company, St. Louis, USA;
- Essigsäure 100 % (etwa 1,05) p.a., Eisessig; CH_3COOH;
- 1-O-α-Glucopryanosyl-β-D-fructo-furanoside (=Sucrose; Saccharose; Cane sugar); Reinheitsgrad Grade I; Fa. Sigma Chemical Company, St. Luois, USA;
- Methanol p.a.; CH_3OH;
- Natriumacetat wasserfrei p.a.; CH_3COONa;
- Natriumazid; NaN_3;
- R 1881 (Methyltrienolone); Fa. New England Nuclear, Boston, USA;
- Salzsäure 1 N; HCL; Faktor F=1,000;
- Schwefelsäure p.a. (etwa 1,84);
- Serumalbumin vom Rind, trocken, reinst; Fa. Behring;
- Trichloressigsäure p.a.; CCl_3COOH;
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan; $C_4H_{11}NO_3$ =Tris, Aminomethylidintrimethanol;
- Unisolve I; Gelszintillator für wässriges und nichtwässriges Probenmaterial; Fa. Tinsser, Frankfurt (Koch-Light Lab. Ltd.);

2.3. Geräte

- Elektrophoresegeräte:
  a. Vorrichtung zum Plattengießen; Fa. Hölzel, Dorfen;
  b. Netzanschlußgerät; Fa. Desaga, Heidelberg;
  c. Kühlapparatur; Fa. Haake;
  d. Elektrophoresewanne; Fa. Hölzle, München;
- Eppendorfpipetten
- Gelplattenschneidegerät; Entwicklung des MPI für Zellbiologie in Wilhelmshaven (Abt. Jungblut)

--dort wurden auch die Vorrichtung zum Plattengießen und die Elektrophoresewanne entwickelt.

- Glasplatten
- Mikrodismembrator Typ 85 30 67; Fa. Braun, Melsungen;
- Mikropipette 5 ul; Oxford Lab.;
- pH-Messgerät; pH-Meter E 300 mit Elektrode KCl 3M; Fa. Methrom, Herisau;
- Rührgerät-IKA-Combmag RCT; Fa. Janke und Kunkel, Staufen i.Br.;
- Spektralphotometer M4Q III; Fa. Carl Zeiss;
- Szintillationszählröhrchen-Zinsser-Polyvials^{R}174; Fa. Zinsser, Frankfurt;
- Ultrazentrifuge mit Zubehör;
  a. Beckman Ultrazentrifuge Spinco L2-50B, Serie No. 12006
  b. Beckman Festwinkelrotor Typ 40, Serie No. E 7251, maximale Drehzahl (Upm) 40 000; maximale relative Zentrifugenbeschleunigung (RZB): 144 800; Anzahl der Röhrchen: 12; Winkel zur Achse: 26°; Röhrchenvolumen: 13,5 ml; Rotorgesamtvolumen: 162 ml; k-Wert: 120;
- Zelluloseacetatfolie; Membranfolie; Fa. Sartorius Membranfilter GmbH Göttingen.

2.4 Tiere

Für die Versuche standen ausschließlich männliche Ratten (Auszuchttiere vom Wistar-Stamm) der Fa. Ivanovas, Kißlegg zur Verfügung.

3. METHODEN

3.1. Proteinbestimmung (53)

Mit einer Oxfordpipette werden pro Ansatz 5 ul sap (d.h. 100 000 g-Überstand) auf eine Zelluloseacetatfolie pipettiert. Es entsteht ein Fleck, den man vollständig an der Luft trocknen läßt. Die so behandelte Folie wird nun für 10 min. mit einer Färbelösung bedeckt.

Färbelösung:
1 g Amidoschwarz 10 B
450 mg Methanol p.a.
100 ml Essigsäure 100 %
450 ml Aqua dest.

Anschließend schwenkt man die Folie dreimal 3 Minuten in einer Entfärbelösung.

Entfärbelösung:
1800 ml Methanol p.a.
40 ml Essigsäure 100 %
160 ml Aqua dest.

Die blauen Flecken werden nach vollständiger Trocknung aus der Folie herausgeschnitten und in ein Plastikröhrchen gegeben, in welches zuvor jeweils 1 ml einer Lösung einpipettiert wurde, die die Acetatfolie auflösen kann.

"Verflüssigungslösung":
400 ml Ameisensäure 98 - 100 %
50 ml Essigsäure 100 %
50 g Trichloressigsäure

Die Röhrchen werden verschlossen. Nachdem die Folie verflüssigt ist, wird jedes Röhrchen durch kräftiges Schütteln vollständig gemischt. Anschließend mißt man in einer 1 ml-Quarz-Küvette die Extinktion bei 620 nm und einer Schichtdicke von 10 mm.

Als Leerwert dient eine Folie, auf die 5 ul DST (siehe 3.3.1.3.) aufpipettiert wurde.

Die Standardkurve stellt man mit Rinderserumalbumin her. Die Kurve ist im Bereich von 2 ug bis 80 ug linear.

3.2. DNA-Bestimmung aus dem Homogenat (64)

Es werden zwischen 200 ul und 500 ul Homogenat (3.3.3.) oder Pellet in ein Eppendorfhütchen gegeben und bis zur Weiterverarbeitung bei -70°C aufbewahrt.

Die aufgetaute Probe wird zusammen mit 5 ml vorgekühltem Äthanol und einem kleinen Magnetrührstab in ein Glaszentrifugenröhrchen gegeben und im Eisbad 10 min. lang gerührt. Das Gemisch wird danach für 10 min. bei 2°C und 2500 g zentrifugiert. Der Oberstand wird abgesaugt. Mit dem Sediment wird der oben angeführte Arbeitsgang erneut durchgeführt. Das so erhaltene Sediment wird mit einem 1 : 2 Äthanol-Äther-Gemisch versetzt und wie oben angeführt behandelt. Auch dieser Arbeitsgang wird wiederholt.

Nun läßt man das Sediment an der Luft trocknen, aber nicht austrocknen. Anschließend versetzt man dieses Sediment mit 2,5 ml 0,5 mol/l Perchlorsäure und rührt es bei Raumtemperatur so lange, bis es sich vollständig aufgelöst hat.

Dieses Suspensat bringt man für 60 min. in ein 80°C heißes Wasserbad. Man zentrifugiert nun diese Lösung 10 min. lang bei 2500 g und Raumtemperatur. Der Oberstand wird in ein graduiertes Röhrchen gegeben. Das zurückgebliebene Sediment wird erneut mit 2,5 ml 0,5 mol/l Perchlorsäure

versetzt, ins heiße Wasserbad gegeben und anschließend wieder 10 min. lang bei 2500 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Oberstand wird mit dem zuvor gewonnenen Oberstand vereinigt und mit 0,5 mol/l Perchlorsäure auf 5 ml aufgefüllt.

Die DNA-Bestimmung wird als Farbreaktion durchgeführt. Das dafür notwendige Reagenz wird aufgrund seiner Lichtempfindlichkeit gegen Ende des Versuches erst hergestellt.

Reagenzlösung:
3 g Diphenylamin werden in 120 ml Eisessig in einem 200 ml Meßkolben aufgelöst. Man gibt nun 3 ml konzentrierte Schwefelsäure dazu und füllt den Meßkolben bis zur 200 ml Marke mit Eisessig auf. Vor Gebrauch des Reagenzes gibt man noch 1 ml einer wässrigen Acetaldehydlösung dazu.

Acetaldehydlösung:
40 ul Acetaldehyd
2 ml Aqua dest.

Farbreaktion:
1 ml Oberstand wird mit 2 ml Farbreagenz vermischt, für ca. 16 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur aufbewahrt und anschließend bei 600 nm im Photometer gegen den Leerwert (1 ml 0,5 mol/l Perchlorsäure mit 2 ml Diphenylaminreagenz vermischt) gemessen.

Die Standardlösung wird mit einer Desoxyriboselösung hergestellt. (Konz. 200 ug/ml bzw. 20 ug/ml Lösung). Die Standardkurven ergeben im Bereich von 16 ug/ml bis 90 ug/ml eine Gerade.

3.3. Versuchsdurchführung

3.3.1. Pufferlösungen

3.3.1.1. Michaelispuffer

44,6 g Diäthyl-barbitur-Na, 29,4 g Natriumacetat und 0,7 g Natriumazid werden in 4900 ml Aqua dest. bei 4 - 6°C aufgelöst und mit einer 1mol/l HCL bis zu einem pH von 8,2 versetzt. Anschließend füllt man bis zu einer Menge von 5000 ml mit Aqua dest. auf, wobei sich der pH-Wert nicht ändern darf.

3.3.1.2. Tris-Puffer

6,06 g 0,010 M Tris und 1,63 g 0,005 M Natriumazid werden mit Aqua dest. auf 5000 ml aufgefüllt und mit einer 25 %igen HCL auf den pH-Wert von 7,5 bei 4 - 6°C eingestellt.

3.3.1.3. DTT-Sucrose-Tris-Puffer (DST)

771 mg DTT gibt man in einen 100 ml Meßkolben und füllt mit Tris-Puffer auf.

8,55 g Sucrose gibt man in einen weiten 100 ml Meßkolben und füllt bis zur 100 ml Marke mit dem zuvor hergestellten DTT-Tris-Puffer auf.

3.3.2. Gewinnung und Aufbewahrung der Prostata

Die Tiere werden durch Dekapitation abgetötet. Man eröffnet das Abdomen und präpariert die ventralen Prostatalappen. Diese befreit man von Binde-

gewebe. Die Prostatalappen werden danach mit flüssigem Stickstoff in einem Teflon-Gefäß eingefroren. Sie werden bei -70°C aufbewahrt.

3.3.3. Homogenisierung und Suspendierung

Die Prostata wird in einer Teflonkapsel mit Hilfe einer Wolframcarbidkugel im Mikrosdismembrator homogenisiert.

Arbeitsgang:
Die Teflonkapsel wird in flüssigem Stickstoff 1 Minute vorgekühlt und anschließend im Dismembrator 1 Minute homogenisiert. Dieser Arbeitsgang wird zweimal wiederholt. Nach dem dritten Arbeitsgang wird die zerstossene Prostata nicht mehr gekühlt. Es werden ihr 4 - 6 Volumenteile DST zugesetzt und nach dem Auftauen suspendiert. Die Suspension (siehe DNA-Bestimmung) wird nach dem Abtrennen von 500 ul für die DNA-Bestimmung in ein vorgekühltes Polycarconatröhrchen gegeben.

3.3.4. Gewinnung des 100.000 g-Oberstandes

Die mit der Suspension gefüllten Röhrchen werden 60 min. bei 100.000 g (Rotor Typ 40 bei 40.000 Upm) und 2°C zentrifugiert. Anschließend wird der sap (=100.000 g-Oberstand) mit Hilfe einer Kanüle abgezogen.

3.3.5. Bestimmung der Rezeptormenge aus dem 100.000 g-Oberstand

3.3.5.1. Inkubation

Es werden zwei Ansätze bei +3°C parallel inkubiert.

Ansatz 1 (nicht supprimiert):

100 ul sap
10 ul ^{3}H-R 1881 4 x 10^{-7} mol/l
10 ul Tris
80 ul DST

Ansatz 2 (supprimiert):

100 ul sap
10 ul ^{3}H-R 1881 4 x 10^{-7} mol/l
10 ul R 1881 4 x 10^{-5} mol/l
80 ul DST

Die Konzentration des ^{3}H-Steroids beträgt im Inkubat 2 x 10^{-8} mol/l und die des unmarkierten Steroids 2 x 10^{-6} mol/l.

3.3.5.2. Elektrophorese

3.3.5.2.1 Herstellung von Agarplatten

I. Beschichten der Glasplatten:
Die 85 x 100 x 0,7 mm großen Glasplatten werden mit Methanol entfettet und bei 100°C getrocknet. Auf jede Platte trägt man danach 7 ml einer heißen Lösung aus 100 mg Agar purum und 200 ml Aqua dest. auf und trocknet die beschichtete Platte eine Stunde bei 100°C im Trockenofen. Mit der Agarseite nach oben werden die ausgekühlten Platten in Aluminiumfolie verpackt und trocken und kühl aufbewahrt.

II. Herstellung der Agarplatten:
1,10 g Agar purum und 0,12 g Agarose werden mit 68 ml Miachelispuffer und 67 ml Aqua dest. aufgelöst und unter Rühren bis zur Transparenz erhitzt. Diese Lösung gießt man in eine exakt waagerecht stehende Plexiglasform. Die Luft unter den Glasplatten wird herausgedrückt. Die Flüssigkeit lässt man dann staubfrei und erschütterungsfrei im Kühlraum gelieren. Die Platten werden spätestens nach 24 Stunden weiterverwendet.

III. Elektrophorese:
Eine Stunde vor dem Elektrophoresenbeginn wird die Kühlplatte auf -2°C abgekühlt. Die Puffergefäße werden mit Michaelispuffer aufgefüllt und mit Papierbrücken beschickt. Die zurechtgeschnittenen und gestanzten Agarplatten werden auf die Kühlplatte aufgesetzt, wobei die überhängenden Agarbrücken mit dem Papier in Kontakt kommen. In die ausgestanzten Löcher werden jeweils 50 ul eines Inkubats eingefüllt. Nun läßt man die Elektrophorese mit einem konstanten Strom von 70 mA je Platte für drei Stunden laufen.

IV. Schneiden der Platten:
Die Agarplatten werden mit der kathodischen Seite nach hinten in das Gelschneidegerät eingesetzt. Es werden je 13 anodische und kathodische 3 mm breite und 9 mm lange Fraktionen je Bahn geschnitten. Die einzelnen Fraktionen werden folgendermaßen in die Zählröhrchen gegeben:

Fraktion 1 + 2	: Röhrchen 1
Fraktion 3	: Röhrchen 2
Fraktion 4	: Röhrchen 3
⋮	⋮
Fraktion 14	: Röhrchen 13
Fraktion 15-16	: Röhrchen 14
Fraktion 17-18	: Röhrchen 15
Fraktion 19-20	: Röhrchen 16
Fraktion 21-22	: Röhrchen 17
Fraktion 23-26	: Röhrchen 18
Startlochflüssigkeit	: Röhrchen X

3.3.5.3. Zusatz von Szintillationsflüssigkeit

Die mit den Gelstückchen beschickten Zählröhrchen werden mit 10 ml (Röhrchen X, 2 - 13) bzw. 20 ml (Röhrchen 1, 14 - 18) Szintillationsflüssigkeit aufgefüllt. Nach frühestens 24 Stunden wird jede Probe 10 min. lang in einem β -Zähler bei einem Background von 20 cpm gezählt.

3.3.6. Berechnung der Rezeptormenge

Die Radioaktivität der Gelstücke auf der Anodenseite werden getrennt nach supprimierten und nichtsupprimierten Ansatz aufsummiert. Danach wird die Differenz der beiden Summen gebildet. Um den Einfluß eines Pipettenfehlers möglichst gering zu halten, wurde die Korrekturformel nach Oettling (45,46) angewandt.

$$\Delta korr. = A_1 - (B_1/B_2) \cdot A_2$$

A_1 = cpm auf der Anodenseite des nichtsupprimierten Ansatzes 1
A_2 = cpm auf der Anodenseite des supprimierten Ansatzes 2
B_1 = cpm auf der Kathodenseite des nichtsupprimierten Ansatzes 1
B_2 = cpm auf der Kathodenseite des supprimierten Ansatzes 2

Die Ergebnisse der Messung wurden graphisch dargestellt (Bsp. 4.1.11.).

3.3.7. Radioaktivitätsmessung

I. Die β-Aktivität wurde in dem Gerät Betaszint BF 5003 A (Berthold, Bad Wildbad) gemessen. Für die Proben wurde Unisolve I als Szintillationsflüssigkeit genommen.

II. Die spezifische Radioaktivität beträgt laut Firmenangabe 87 Ci/mmol (3219 GBq/mmol) und das Molekulargewicht 284,4. Es wurde eine 4×10^{-7} mol/l Lösung hergestellt. Von dieser wurden dreimal 10 ul in 10 ml Unisolvel pipettiert und im β-Zähler gezählt.

Erwartet wurden 740.000 cpm/10 ul.
Die Zählung ergab einen Durchschnittswert von 456.802/10 ul, was einer Effektivität von 61,73 % entspricht.

3.3.8. Bestimmung der freien Rezeptormenge (fR) (46)

Der supprimierte Ansatz bzw. nichtsupprimierte Ansatz wird 1 h lang inkubiert. Nach der Elektrophorese wird das Gel wie unter 3.3. beschrieben weiterverarbeitet.

Aus den bei der Zählung erhaltenen Werten errechnet man fR:

$$A_1 - (B_1/B_2) \cdot A_2 = \quad \text{counts}$$

$$\Delta \text{ counts} \times 8{,}4536 \times 10^{-18} = \text{mol/50 ul}$$

3.3.9. Bestimmung des Steroidrezeptorkomplexes (S-R)

Die beiden Ansätze werden 48 h lang inkubiert. Danach verfährt man wie unter 3.3.8. beschrieben.

4. ERGEBNISSE

4.1. Versuchsprotokolle und -werte

Legende zu den Tabellen den folgenden Seiten:

A. Nummer der Versuchsreihe
- Es wurden insgesamt 10 Versuchsreihen in den verschiedenen Altersstufen durchgeführt (4.1.1. - 4.1.10)

B. Alter der Tiere in Tagen (d):
- Für die Versuche wurden Tiere in den Altersstufen zwischen 20 d und 70 d benötigt.
  Da die Tiere von einer Zuchtanstalt bezogen wurden, bestand nicht immer die Gewißheit, daß das angegebene Alter auch das wahre Alter der Tiere war.

C. Nummer der Teilversuche:
- Zu den 10 Versuchsreihen wurden insgesamt 40 Teilversuche durchgeführt.

D. Supprimierte und nichtsupprimierte Bindungen pro 50 ul sap (10^{-15}mol/50 ul)
- Wert nach 1 h Inkubation

E. Supprimierte und nichtsupprimierte Bindung pro 50 ul sap (10^{-15}mol/50 ul)
- Wert nach 48 h Inkubation

F. Prostatagewicht in mg
- Gesamtgewicht pro Teilversuch

G. Prostatagewicht in mg
- Gewicht in mg pro Tier (F/n)

H. Sap-Menge in ul
   - Gesamtvolumen in ul pro Teilversuch

I. Sap-Menge in ul
   - Volumen pro Tier (H/n)

K. ug Protein pro 50 ul sap

L. DNA-Konzentration pro Homogenat (ug/ml)

M. DNA pro Tier in ug

N. Anzahl der Tiere pro Teilversuch

Tabellen:

A	4.1.1.	4.1.1.	4.1.2.	A
B	20	20	30	B
C	1	2	3	C
D	4,3	2,7	3,0	D
E	22,4	15,6	7,0	E
F	618	527	500	F
G	10,3	10,5	27,8	G
H	1400	1250	1400	H
I	23,3	25	77,8	I
K	38,95	36,55	35,35	K
L	857,22	605,9	441,65	L
M	42,87	36,35	73,61	M
N	60	50	18	N

A	4.1.2.	4.1.2.	4.1.3.	A
B	30	30	35	B
C	4	5	6	C
D	2,0	3,8	10,0	D
E	3,6	5,0	15,2	E
F	471	469	625	F
G	26,2	26	39,1	G
H	1200	1100	1350	H
I	66,7	61,1	84,4	I
K	35,21	40,14	58,15	K
L	487,8	592,8	571,66	L
M	73,17	88,93	103,61	M
N	18	18	16	N

A	4.1.3.	4.1.3.	4.1.4.	A
B	35	35	40	B
C	7	8	9	C
D	6,3	8,0	2,0	D
E	12,7	10,6	9,1	E
F	559	503	564	F
G	34,9	33,53	47	G
H	1275	1250	1500	H
I	79,7	83,3	125	I
K	56,75	49,99	35,13	K
L	452,48	540,7	386,49	L
M	87,66	108,15	106,28	M
N	16	15	13	N

A	4.1.4.	4.1.4.	4.1.4.	A
B	40	40	40	B
C	10	11	12	C
D	2,2	5,8	3,3	D
E	6,7	9,2	8,3	E
F	581	622	412	F
G	48,4	51,8	37,5	G
H	1550	1700	950	H
I	129,2	141,7	86,36	I
K	39,38	48,49	51,47	K
L	372,23	545,41	450,2	L
M	105,46	163,53	98,23	M
N	12	12	11	N

A	4.1.4.	4.1.5.	4.1.5.	A
B	40	45	45	B
C	13	14	15	C
D	4,7	2,8	2,8	D
E	17,2	7,1	7,8	E
F	477	471	446	F
G	39,8	47,1	44,6	G
H	1100	1100	1050	H
I	91,66	110	105	I
K	47,32	39,9	36,9	K
L	501,4	433,3	447,8	L
M	119,92	123,49	119,66	M
N	12	10	10	N

A	4.1.5.	4.1.5.	4.1.5.	A
B	45	45	45	B
C	16	17	18	C
D	2,8	3,9	2,7	D
E	8,4	8,9	6,2	E
F	434	510	475	F
G	43,4	51	47,5	G
H	1050	1250	1100	H
I	105	125	110	I
K	42,7	47,3	50,5	K
L	360	366,1	487,7	L
M	93,6	109,83	138,99	M
N	10	10	10	N

A	4.1.6.	4.1.6.	4.1.6.	A
B	50	50	50	B
C	19	20	21	C
D	3,1	4,8	3,0	D
E	8,8	8,6	8,1	E
F	456	438	509	F
G	65,1	62,6	72,7	G
H	1200	1150	1400	H
I	171,4	164,3	200	I
K	47,42	48,93	51,39	K
L	387,47	353	449,52	L
M	143.91	126,07	192,65	M
N	7	7	7	N

A	4.1.6.	4.1.6.	4.1.7.	A
B	50	50	55	B
C	22	23	24	C
D	3,8	2,8	3,3	D
E	7,8	12,1	9,8	E
F	575	451	381	F
G	82,1	64,4	95,2	G
H	1400	1050	1050	H
I	200	150	262,5	I
K	48,39	44,21	49,23	K
L	437	553,7	450,5	L
M	210.69	209,61	180,2	M
N	7	7	4	N

A	4.1.7.	4.1.7.	4.1.7.	A
B	55	55	55	B
C	25	26	27	C
D	3,5	3,4	3,2	D
E	15,0	11,7	11,5	E
F	567	679	680	F
G	94,5	113.2	113,3	G
H	1500	1800	1800	H
I	250	300	300	I
K	54,23	46,51	56,6	K
L	535,9	611,7	685,3	L
M	294,75	397,6	445,44	M
N	6	6	6	N

A	4.1.8.	4.1.8.	4.1.8.	A
B	60	60	60	B
C	28	29	30	C
D	4,5	5,6	4,3	D
E	11,1	16,5	6,9	E
F	594	355	351	F
G	148,5	118,3	117	G
H	1400	800	800	H
I	350	266,7	266,7	I
K	62,34	47,53	46,51	K
L	513,55	572,5	514,9	L
M	398	271,94	244,57	M
N	4	3	3	N

A	4.1.8.	4.1.9.	4.1.9.	A
B	60	65	65	B
C	31	32	33	C
D	6,0	4,0	4,7	D
E	10,1	7,9	9,9	E
F	419	476	584	F
G	139,7	158,7	194,7	G
H	1000	1300	1500	H
I	333,3	433,3	500	I
K	50,95	54,43	57,59	K
L	579,2	641,9	541,3	L
M	333,04	620,5	595,43	M
N	3	3	3	N

A	4.1.9.	4.1.9.	4.1.10.	A
B	65	65	70	B
C	34	35	36	C
D	4,1	3,3	7,6	D
E	9,8	7,4	20,5	E
F	542	509	454	F
G	180,7	169,7	151,3	G
H	1400	1400	1400	H
I	466,7	466,7	466,7	I
K	54,63	47,51	43,35	K
L	596,5	705,6	360,8	L
M	616,38	729,12	372,83	M
N	3	3	3	N

A	4.1.10.	4.1.10.	4.1.10.	A
B	70	70	70	B
C	37	38	39	C
D	7,1	4,0	5,5	D
E	11,2	9,9	9,4	E
F	317	676	495	F
G	158,5	169	165	G
H	850	1500	1200	H
I	425	375	400	I
K	48,93	63,31	58,58	K
L	275,19	538,17	599,79	L
M	183,36	591,99	539,82	M
N	2	4	3	N

A	4.1.10.
B	70
C	40
D	8,1
E	17,0
F	407
G	135,7
H	950
I	317
K	58,38
L	592,12
M	434,22
N	3

4.1.11.

Nachdem die einzelnen Gelstückchen im Beta-Zähler gezählt wurden, reiht man das Ergebnis auch in einer graphischen Darstellung auf. Als Beispiel siehe Abb. 1a und 1b sowie Protokoll Nr. 29 (60 d alte Tiere, Versuch Nr. 29, Versuchsdatum 07.02.1980).

Durch die graphische Darstellung soll eine Fehlinterpretation verhindert werden.

Protokoll zu Versuch Nr. 29 vom 07.02.1980 Teil A
Inkubation: 1h BG: 20 cpm

(9), (10) : Bahnen auf den Agarplatten

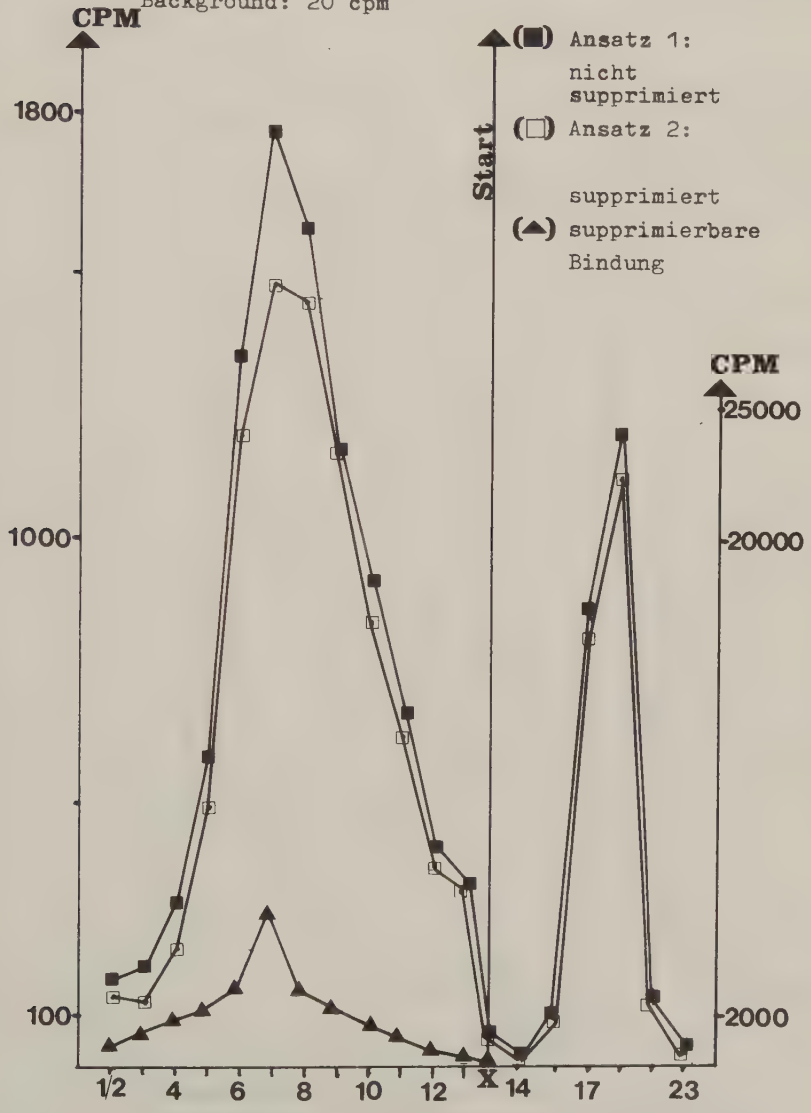
Zählung	(9) 3.1.	1-13 △	(10) 3.2.	14-26
1+2	159	30	129	(9)
3	181	60	121	262
4	300	79	221	2150
5	687	101	586	17155
6	1340	148	1192	23902
7	1758	292	1466	2661
8	1578	141	1437	143
9	1267	112	1155	
10	910	80	830	∑:46 723
11	670	54	616	
12	406	32	374	(10)
13	346	20	326	259
				1907
		△		16049
A	9602	1149	8453	22221
x	57	7	50	2568
14-26	46273		43758	756
B	46273		43758	∑:43 758

B_2/A_2 : 5,18

Δkorr. : 663,11

mol/Vol. : $5,6 \times 10^{-15}$ mol/50 ul

Abb.1a : Analyse des Inkubationsansatzes mit der Agargelelektrophorese
Inkubationszeit: 1 Stunde
Background: 20 cpm



1-23: Nummer der Gelfraktionen auf der Agarplatte

Protokoll zu Versuch Nr. 29 vom 07.02.1980 Teil B
Inkubation: 48h BG: 20 cpm

Zählung	(30) 3.1.	1-13 Δ	(31) 3.2.	14-26
1+2	172	40	132	(30)
3	288	52	236	207
4	600	68	532	1129
5	1384	141	1243	25026
6	1819	296	1523	11990
7	1599	364	1235	3594
8	1467	232	1235	162
9	1243	151	1092	
10	977	106	871	Σ:42108
11	704	84	620	
12	510	79	431	(31)
13	251	33 Δ	218	229
				1256
A	11014	1646	9368	25349
x	0	0	0	12176
14-26	42108		43165	3967
				188
B	42108		43165	Σ:43165

B_2/A_2 : 4,66

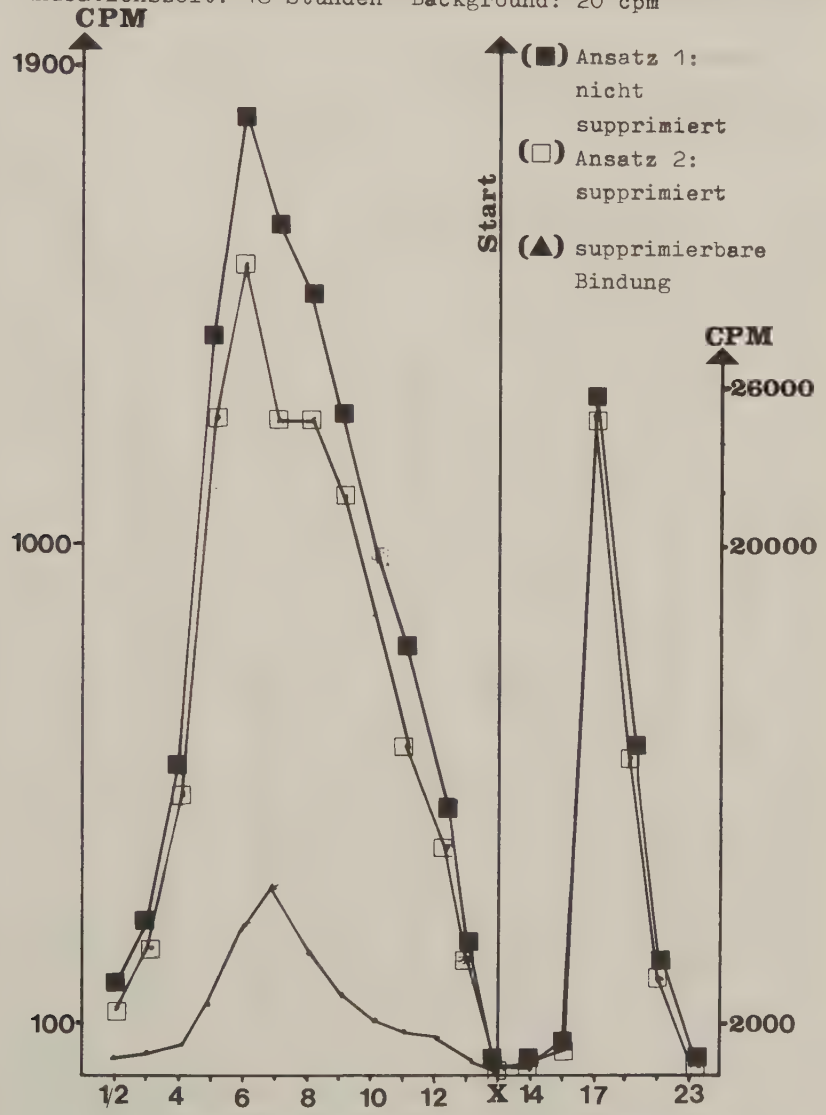
$\Delta_{korr.}$: 1969,77

mol/Vol. : $16,5 \times 10^{-15}$ mol/50 ul

Analyse des Inkubationsansatzes mit der Agarelektrophorese

Abb.1b

Inkubationszeit: 48 Stunden Background: 20 cpm



1-23: Nummer der Gelfraktion auf der Agarplatte

Legende der gleichbleibenden Abkürzungen für die Tabellen 4.2. - 4.16.:

I: Nummer des Versuches
II: Nummer des Teilversuches
III: Alter des Tieres in Tagen

4.2. Menge Prostata pro Tier in mg

I	II	III	Gewicht (mg)	I	II	III	Gewicht (mg)
1	1	20	10,3	21	3	50	72,7
2	2	20	10,5	22	4	50	82,1
3	1	30	27,8	23	5	50	64,4
4	2	30	26,2	24	1	55	95,2
5	3	30	26	25	2	55	94,5
6	1	35	39,1	26	3	55	113,2
7	2	35	35,9	27	4	55	113,3
8	3	35	33,5	28	1	60	148,5
9	1	40	47	29	2	60	118,3
10	2	40	48,4	30	3	60	117
11	3	40	51,8	31	4	60	139,7
12	4	40	37,5	32	1	65	158,7
13	5	40	39,8	33	2	65	194,7
14	1	45	47,1	34	3	65	180,7
15	2	45	44,6	35	4	65	169,7
16	3	45	43,4	36	1	70	151,3
17	4	45	51	37	2	70	158,5
18	5	45	47,5	38	3	70	169
19	1	50	65,1	39	4	70	165
20	2	50	62,6	40	5	70	135,7

Anmerkungen zu den Abbildungen:

Die in den Abbildungn angegebenen Ziffern entsprechen den Ziffern der einzelnen Teilversuchen der jeweiligen Altersgruppen.

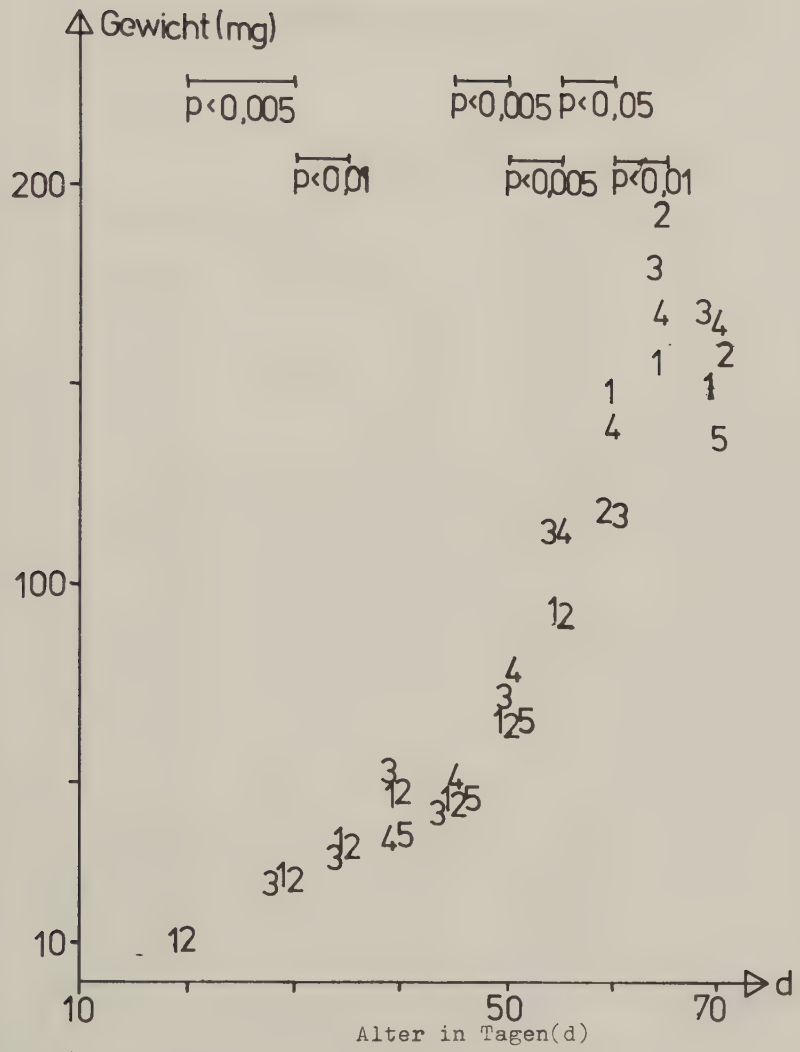


Abb.2

Diagramm zu 4.2.

" Prostatagewicht pro Tier in mg "

4.3. ug lösliches Protein im 100 000 g-Überstand des Prostatahomogenates

4.3.1. ug Protein pro 5 ul 100 00 g-Überstand

I	II	III	Protein (ug)	I	II	III	Protein (ug)
1	1	20	38,95	21	3	50	51,39
2	2		36,55	22	4		48,39
3	1	30	35,45	23	5		44,21
4	2		35,21	24	1	55	49,23
5	3		40,15	25	2		54,23
6	1	35	35,15	26	3		46,21
7	2		56,75	27	4		56,6
8	3		49,99	28	1	60	62,34
9	1	40	35,13	29	2		47,53
10	2		39,38	30	3		46,51
11	3		48,49	31	4		50,95
12	4		51,47	32	1	65	54,43
13	5		47,32	33	2		57,59
14	1	45	39,9	34	3		54,63
15	2		36,9	35	4		47,51
16	3		42,7	36	1	70	43,35
17	4		47,3	37	2		48,93
18	5		50,5	38	3		63,31
19	1	50	47,2	39	4		58,58
20	2		48,93	40	5		58,38

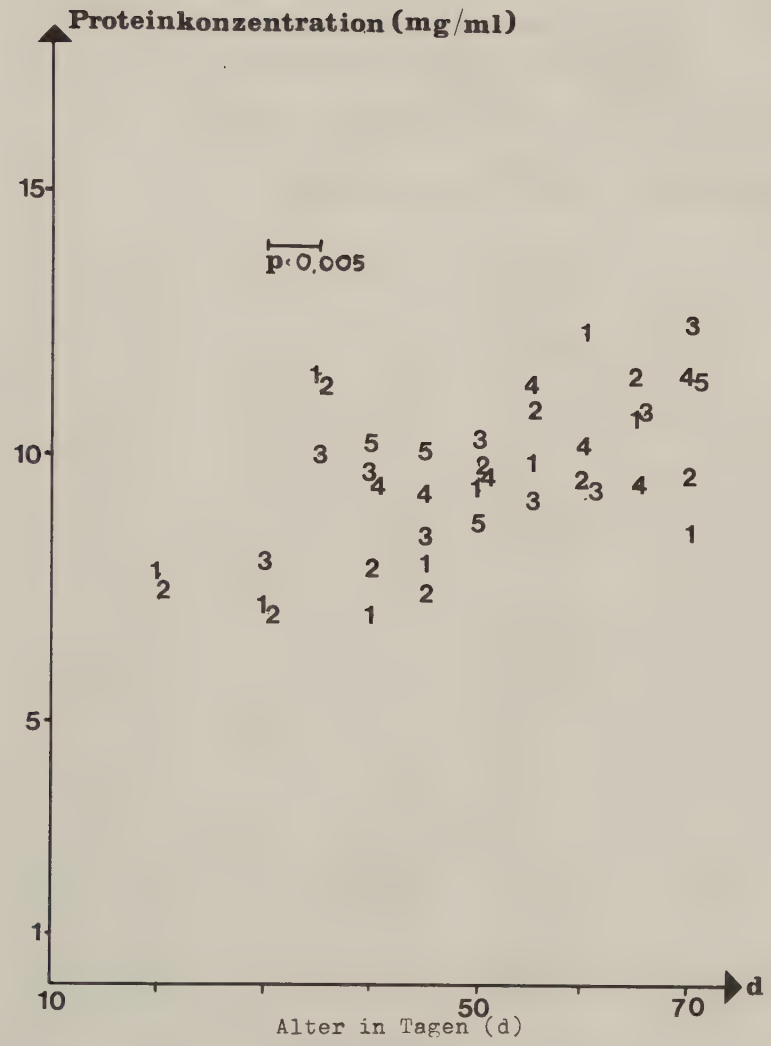


Abb.3:
Diagramm zu 4.3.1.
"ug lösliches Protein pro 5 ul 100 000 g-Überstand
des Prostatahomogenats "

4.3.2. Lösliches Protein im 100 000 g-Überstand des Prostatahomogenates bezogen auf ein Tier

Aus I und 4.3.1. läßt sich folgende Gleichung ableiten:

ug Protein (4.3.1.) x I : 5 = ug Protein pro Tier

I	II	III	Wert (ug)	I	II	III	Wert (ug)
1	1	20	181,51	21	3	50	2055,6
2	2		182,75	22	4		1935,6
3	1	30	551,6	23	5		1326,3
4	2		470,4	24	1	55	2584,58
5	3		490,63	25	2		2711,5
6	1	35	981,57	26	3		2772,6
7	2		904,59	27	4		3396
8	3		832,83	28	1	60	4363,8
9	1	40	878,25	29	2		2535,25
10	2		1017,58	30	3		2480,84
11	3		1374,21	31	4		3396,33
12	4		888,99	32	1	65	4716,9
13	5		867,47	33	2		5759
14	1	45	877,8	34	3		5099,16
15	2		774,9	35	4		4434,58
16	3		896,7	36	1	70	4046,29
17	4		1182,5	37	2		4159,05
18	5		1111	38	3		4748,25
19	1	50	1618,02	39	4		4686,4
20	2		1607,84	40	5		3701,29

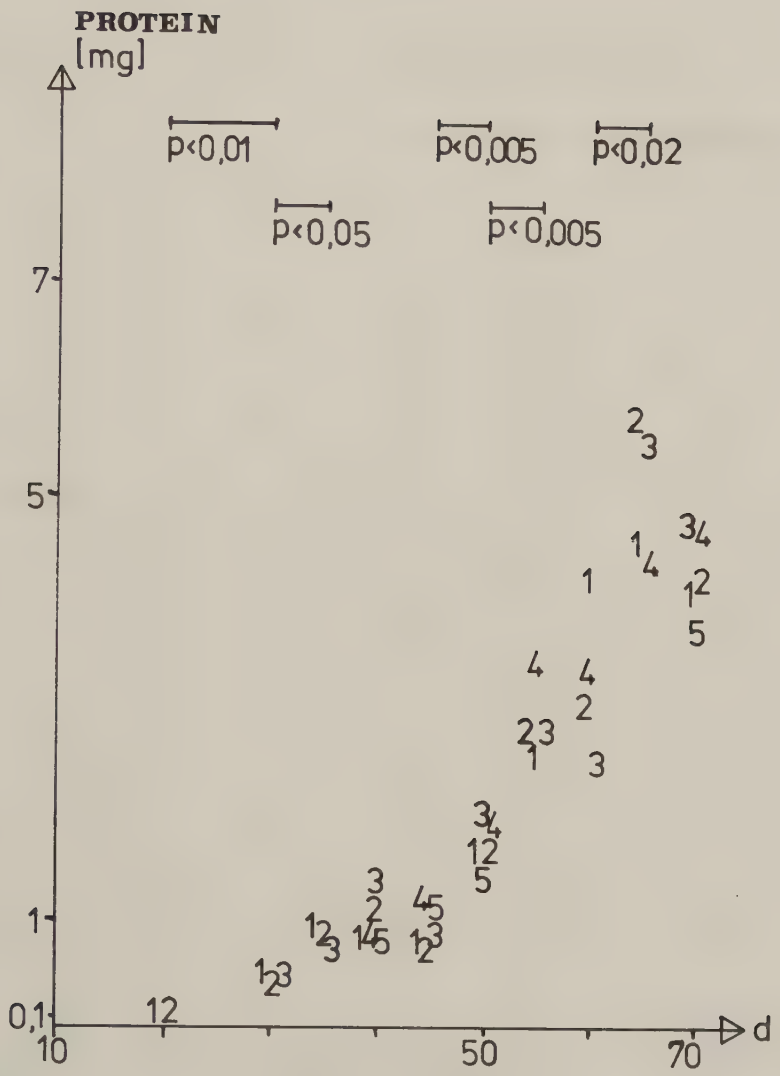


Abb.4 Alter in Tagen (d)

Diagramm zu 4.3.2.

" Lösliches Protein im 100 000 g-Überstand des Prostatahomogenats bezogen auf ein Tier "

4.4. DNA-Konzentration (ug/ml)

Die DNA-Bestimmung wurde nach 3.2. durchgeführt.

I	II	III	Wert (ug/ml)	I	II	III	Wert (ug/ml)
1	1	20	857,2	21	3	50	449,5
2	2		605,9	22	4		437
3	1	30	441,6	23	5		553,7
4	2		487,8	24	1	55	450,5
5	3		592,8	25	2		535,9
6	1	35	571,7	26	3		611,7
7	2		452,5	27	4		685,3
8	3		540,7	28	1	60	513,6
9	1	40	386,5	29	2		572,5
10	2		372,2	30	3		514,9
11	3		545,1	31	4		579,2
12	4		450,2	32	1	65	641,9
13	5		501,4	33	2		541,3
14	1	45	433,3	34	3		596,5
15	2		447,8	35	4		705,6
16	3		360	36	1	70	360,8
17	4		366,1	37	2		275,2
18	5		487,7	38	3		538,2
19	1	50	387,5	39	4		599,8
20	2		353	40	5		592,1

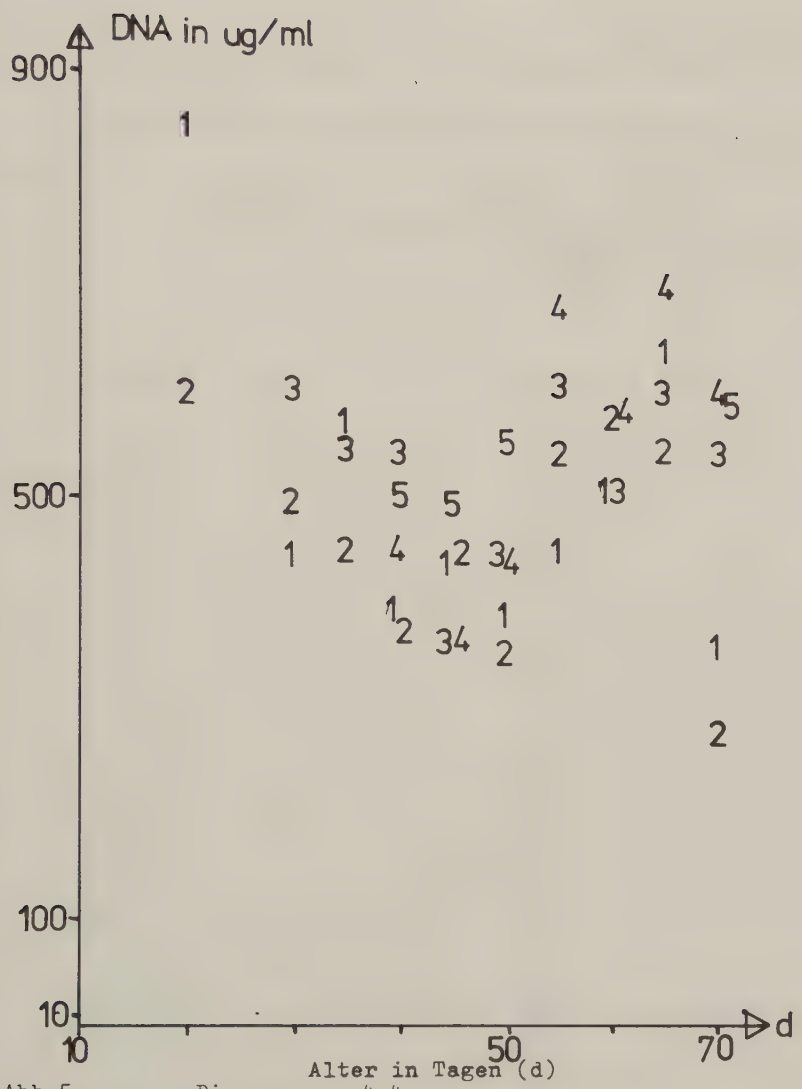


Abb.5 Diagramm zu 4.4.

" DNA-Konzentration in ug pro ml Homogenat "

4.5. Menge DNA in ug pro Tier

Die dafür notwendige Umrechnung ergibt sich aus 4.4. durch folgende Gleichung:

$$\frac{\text{Volumen des Homogenates x DNA-Konzentration (4.4.)}}{\text{Anzahl der Tiere x 1000}} = 4.5.$$

I	II	III	Wert (ug)	I	II	III	Wert (ug)
1	1	20	43,87	21	3	50	192,65
2	2		36,35	22	4		210,69
3	1	30	73,61	23	5		209,61
4	2		73,17	24	1	55	180,2
5	3		88,93	25	2		294,75
6	1	35	103,61	26	3		397,6
7	2		87,66	27	4		445,44
8	3		108,15	28	1	60	398
9	1	40	106,28	29	2		271,94
10	2		105,46	30	3		244,57
11	3		163,53	31	4		333,04
12	4		98,23	32	1	65	620,5
13	5		119,92	33	2		595,43
14	1	45	123,49	34	3		616,38
15	2		118,66	35	4		729,12
16	3		93,6	36	1	70	372,83
17	4		109,83	37	2		183,36
18	5		138,99	38	3		591,99
19	1	50	143,91	39	4		539,81
20	2		126,07	40	5		434,22

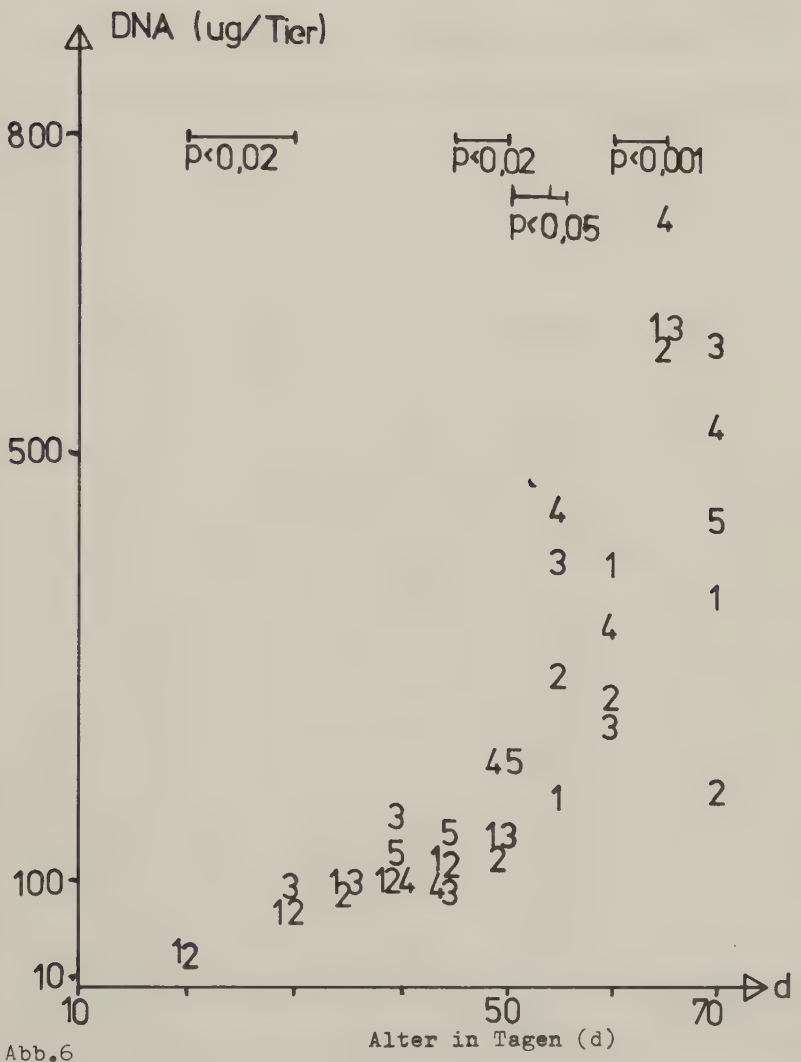


Abb.6

Diagramm zu 4.5.

" Menge DNA in ug pro Tier "

4.6. Menge DNA in ug bezogen auf 1 g Prostata

Die Werte von 4.6. lassen sich über folgende Gleichung errechnen:

$$\frac{(4.5.)}{(4.2.)} = \text{Wert von 4.6.}$$

I	II	III	Wert (ug)	I	II	III	Wert (ug)
1	1	20	4,16	21	3	50	2,65
2	2		3,46	22	4		2,57
3	1	30	2,65	23	5		3,25
4	2		2,79	24	1	55	1,89
5	3		3,42	25	2		3,12
6	1	35	2,65	26	3		3,51
7	2		2,51	27	4		3,93
8	3		3,23	28	1	60	2,68
9	1	40	2,26	29	2		2,29
10	2		2,18	30	3		2,09
11	3		3,18	31	4		2,38
12	4		2,62	32	1	65	3,91
13	5		3,01	33	2		3,06
14	1	45	2,62	34	3		3,41
15	2		2,66	35	4		4,29
16	3		2,16	36	1	70	2,46
17	4		2,15	37	2		1,16
18	5		2,93	38	3		3,50
19	1	50	2,21	39	4		3,27
20	2		2,01	40	5		3,4

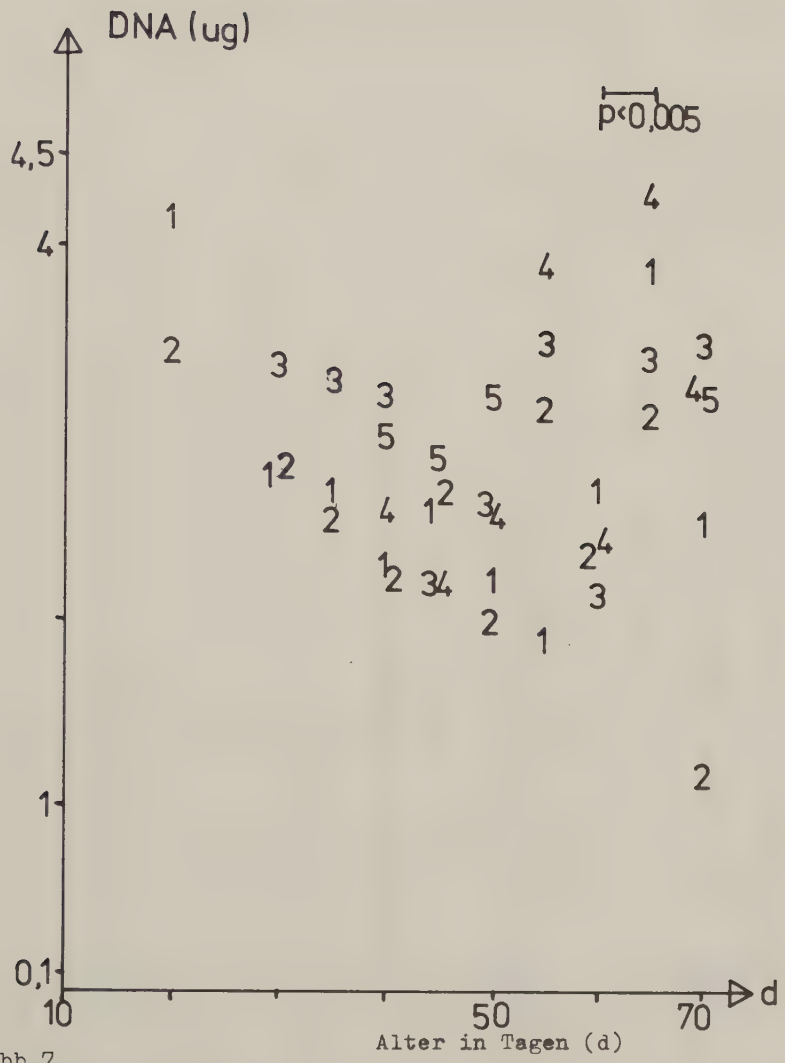


Abb.7
Diagramm zu 4.6.
" Menge DNA in ug bezogen auf 1 g Prostata "

4.7. Quotient aus DNA pro Tier / Protein pro Tier

Gleichung:

$$\frac{\text{DNA pro Tier in ug (4.5.)}}{\text{Protein pro Tier in ug (4.3.2.)}} = \text{Wert (4.7.)}$$

I	II	III	Wert	I	II	III	Wert
1	1	20	0,236	21	3	50	0,094
2	2		0,199	22	4		0,109
3	1	30	0,133	23	5		0,158
4	2		0,156	24	1	55	0,07
5	3		0,181	25	2		0,109
6	1	35	0,106	26	3		0,143
7	2		0,097	27	4		0,131
8	3		0,13	28	1	60	0,091
9	1	40	0,121	29	2		0,107
10	2		0,104	30	3		0,099
11	3		0,119	31	4		0,098
12	4		0,11	32	1	65	0,132
13	5		0,138	33	2		0,103
14	1	45	0,141	34	3		0,121
15	2		0,153	35	4		0,164
16	3		0,104	36	1	70	0,092
17	4		0,093	37	2		0,044
18	5		0,125	38	3		0,125
19	1	50	0,089	39	4		0,115
20	2		0,078	40	5		0,117

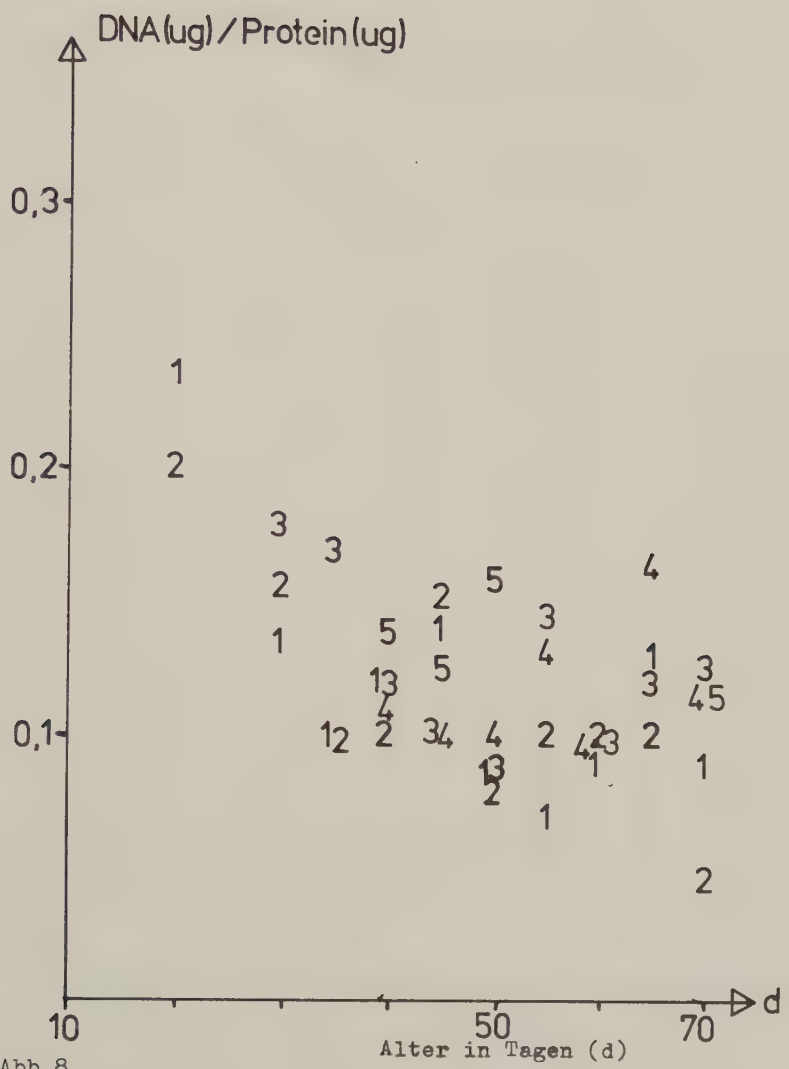


Abb.8
Diagramm zu 4.7.
" Quotient aus DNA pro Tier / Protein pro Tier "

4.8. Supprimierbare Aktivität nach 1 Stunde Inkubation pro 50 ul Inkubat

I	II	III	Wert (fmol ^{3}H-R 1881)	I	II	III	Wert (fmol ^{3}H-R 1881)
1	1	20	4,28	21	3	50	2,98
2	2		2,66	22	4		3,75
3	1	30	3,02	23	5		2,79
4	2		1,99	24	1	55	3,33
5	3		3,82	25	2		3,47
6	1	35	10,0	26	3		3,39
7	2		6,32	27	4		3,21
8	3		8,04	28	1	60	4,45
9	1	40	1,95	29	2		5,56
10	2		2,17	30	3		4,3
11	3		5,78	31	4		6,01
12	4		3,29	32	1	65	3,95
13	5		4,73	33	2		4,72
14	1	45	2,83	34	3		4,1
15	2		2,78	35	4		3,27
16	3		2,8	36	1	70	7,55
17	4		3,91	37	2		7,11
18	5		2,74	38	3		3,96
19	1	50	3,08	39	4		5,53
20	2		4,75	40	5		8,14

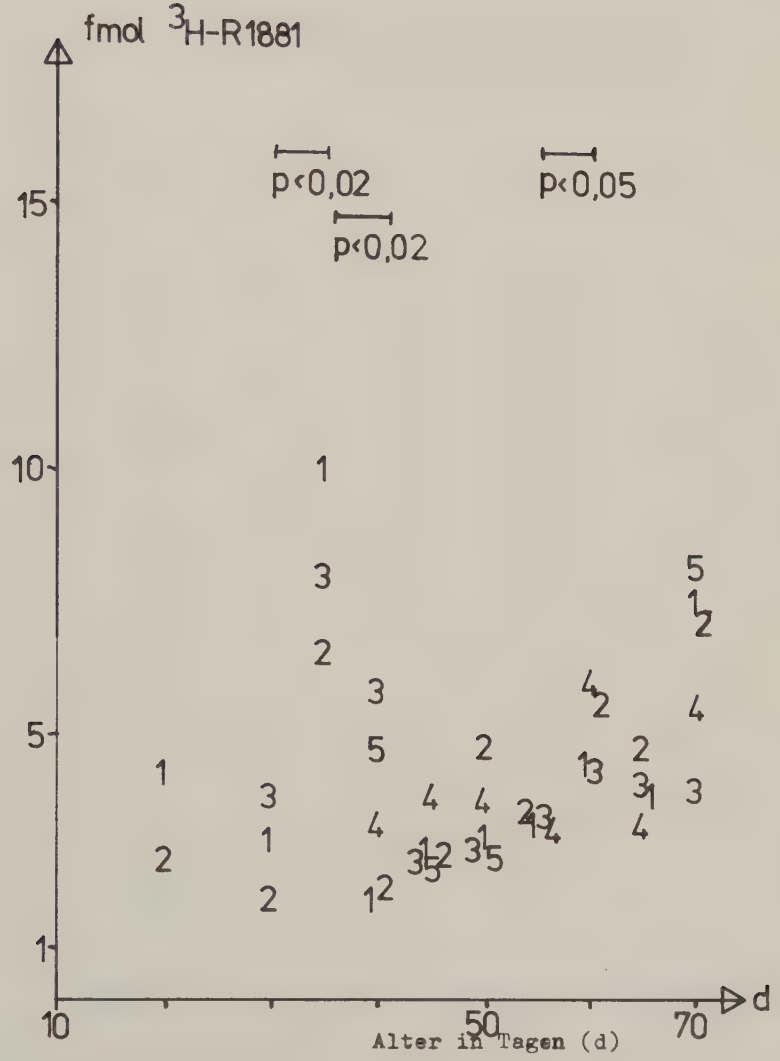


Abb.9

Diagramm zu 4.8.

"Supprimierbare Aktivität nach 1 Stunde Inkubation pro 50 ul Inkubat."

4.9. Supprimierbare Aktivität nach 48 Stunden Inkubation pro 50 ul Inkubat

I	II	III	Wert (fmol ^{3}H-R 1881)	I	II	III	Wert (fmol ^{3}H-R 1881)
1	1	20	22,39	21	3	50	8,07
2	2		15,63	22	4		7,84
3	1	30	6,92	23	5		12,07
4	2		3,62	24	1	55	9,77
5	3		4,98	25	2		14,92
6	1	35	15,15	26	3		11,73
7	2		12,67	27	4		11,48
8	3		10,6	28	1	60	11,13
9	1	40	9,10	29	2		16,52
10	2		6,73	30	3		6,88
11	3		9,15	31	4		10,1
12	4		8,32	32	1	65	7,85
13	5		17,22	33	2		9,98
14	1	45	7,06	34	3		9,75
15	2		7,76	35	4		7,39
16	3		8,35	36	1	70	20,5
17	4		8,87	37	2		11,18
18	5		6,27	38	3		9,86
19	1	50	8,77	39	4		9,41
20	2		8,58	40	5		17,03

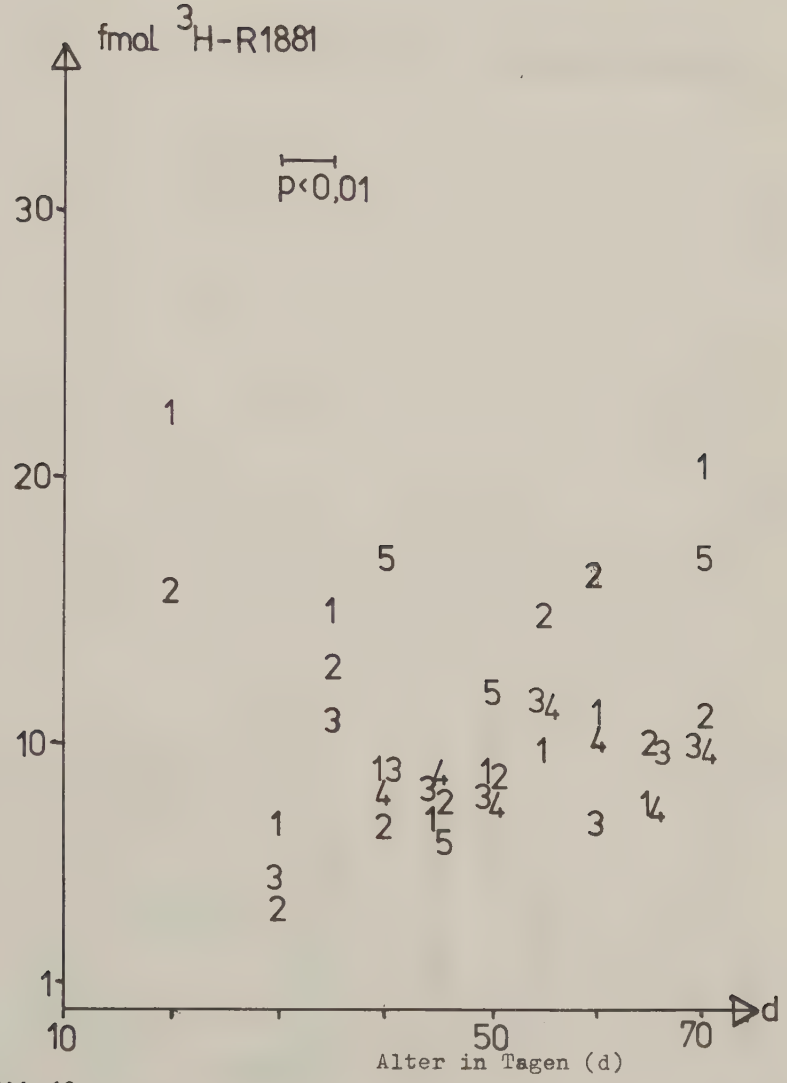


Abb.10
Diagramm zu 4.9.
"Supprimierbare Aktivität nach 48 Stunden Inkubation pro 50 ul Inkubat."

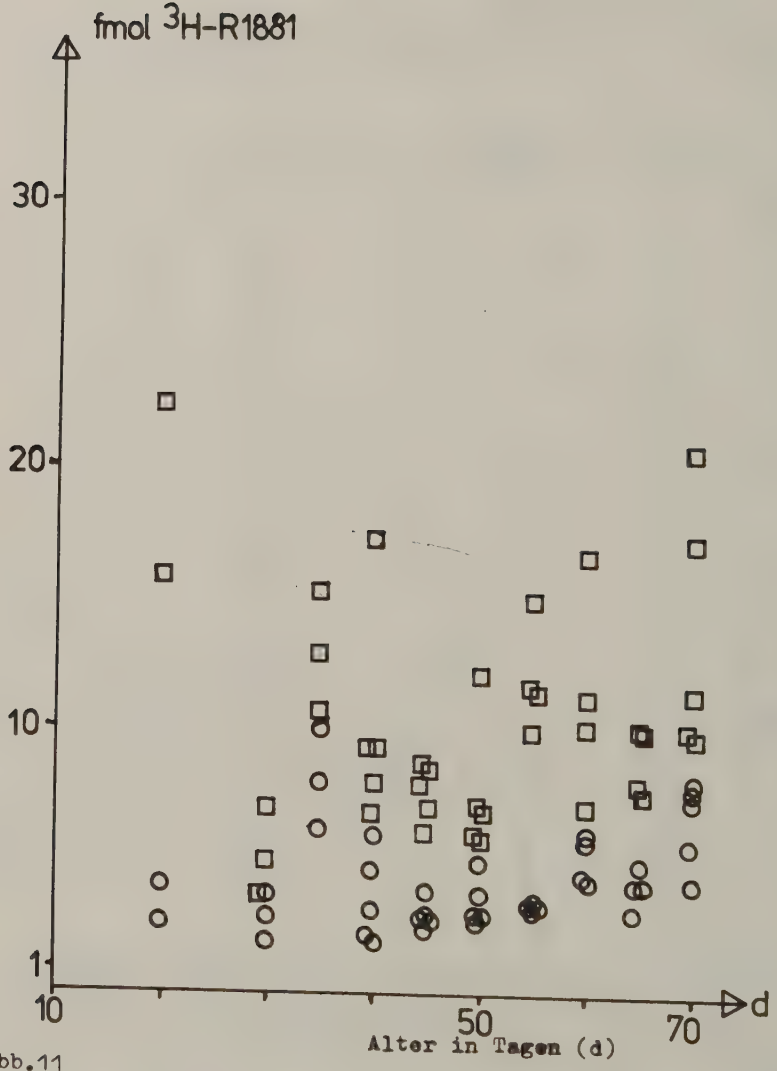


Abb.11

Diagramm zu 4.8. und 4.9.

"Supprimierbare Aktivität nach 1 Stunde(●)und 48 Stunden (□) Inkubation pro 50 ul Inkubat."

4.10. Rezeptor zur Zeit der Suspendierung (t = 0)

4.10.1. Freier Rezeptor zur Zeit t = 0 (fR_0)

Es gilt die Gleichung:

$$fR_0 = 1{,}103 \times (4.8.) - 0{,}05 \times (4.9.)$$

I	II	III	Wert (fmol ^{3}H-R 1881)	I	II	III	Wert (fmol ^{3}H-R 1881)
1	1	20	3,6	21	3	50	2,88
2	2		2,15	22	4		3,74
3	1	30	2,98	23	5		2,47
4	2		2,01	24	1	55	3,18
5	3		3,96	25	2		3,08
6	1	35	10,27	26	3		3,15
7	2		6,34	27	4		2,97
8	3		8,34	28	1	60	4,35
9	1	40	1,69	29	2		5,31
10	2		2,06	30	3		4,73
11	3		5,92	31	4		6,12
12	4		3,21	32	1	65	3,96
13	5		4,36	33	2		4,71
14	1	45	2,77	34	3		4,03
15	2		2,68	35	4		3,24
16	3		2,67	36	1	70	7,3
17	4		3,87	37	2		7,28
18	5		2,71	38	3		3,87
19	1	50	2,96	39	4		5,63
20	2		4,81	40	5		8,12

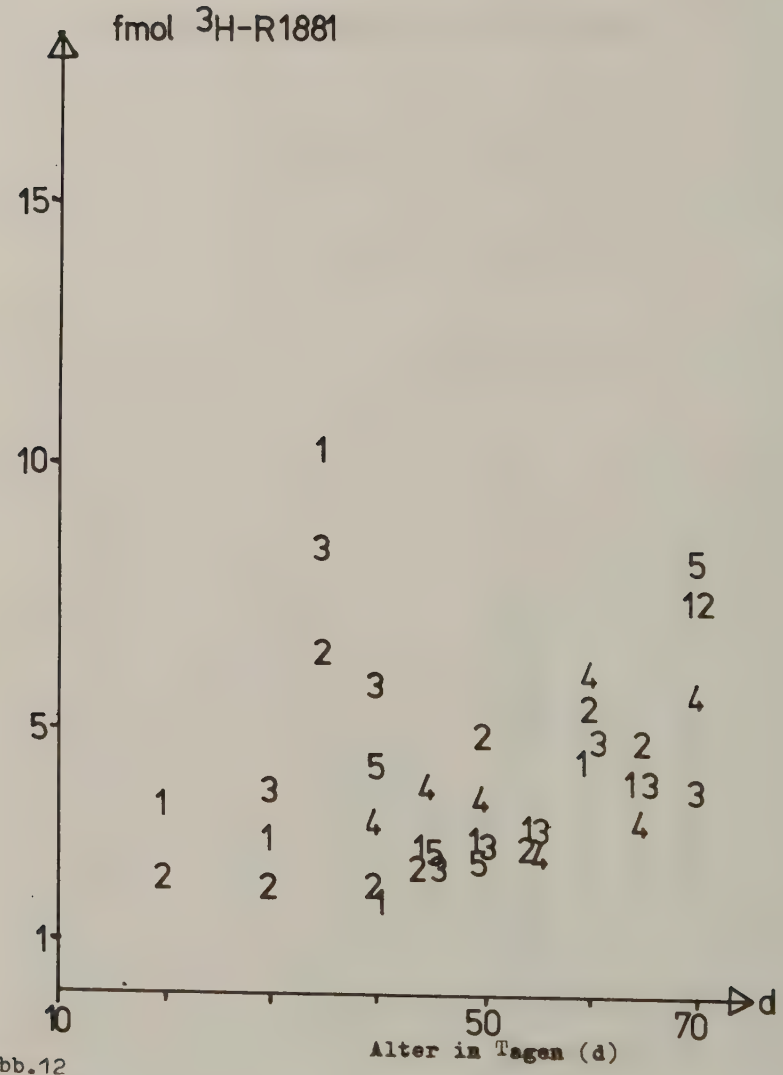


Abb.12

Diagramm zu 4.10.1.

"Freier Rezeptor zur Zeit t = 0 (fR_o)!"

4.10.2. Steroidrezeptorkomplex zur Zeit t = 0 ($S\text{-}R_0$)

Es gilt die Gleichung:

$$S\text{-}R_0 = 1{,}327 \times (4.9.) - 1{,}215 \times (4.8.)$$

I	II	III	Wert (fmol ^{3}H-R 1881)	I	II	III	Wert (fmol ^{3}H-R 1881)
1	1	20	24,51	21	3	50	7,09
2	2		17,51	22	4		5,85
3	1	30	5,51	23	5		12,63
4	2		2,39	24	1	55	8,92
5	3		1,97	25	2		15,83
6	1	35	7,95	26	3		11,45
7	2		9,13	27	4		11,33
8	3		4,3	28	1	60	9,36
9	1	40	9,71	29	2		15,17
10	2		6,29	30	3		3,91
11	3		5,12	31	4		6,1
12	4		7,04	32	1	65	5,62
13	5		17,1	33	2		7,51
14	1	45	5,93	34	3		7,96
15	2		6,92	35	4		5,83
16	3		7,68	36	1	70	18,03
17	4		7,02	37	2		6,2
18	5		4,86	38	3		8,27
19	1	50	7,9	39	4		5,77
20	2		5,62	40	5		12,71

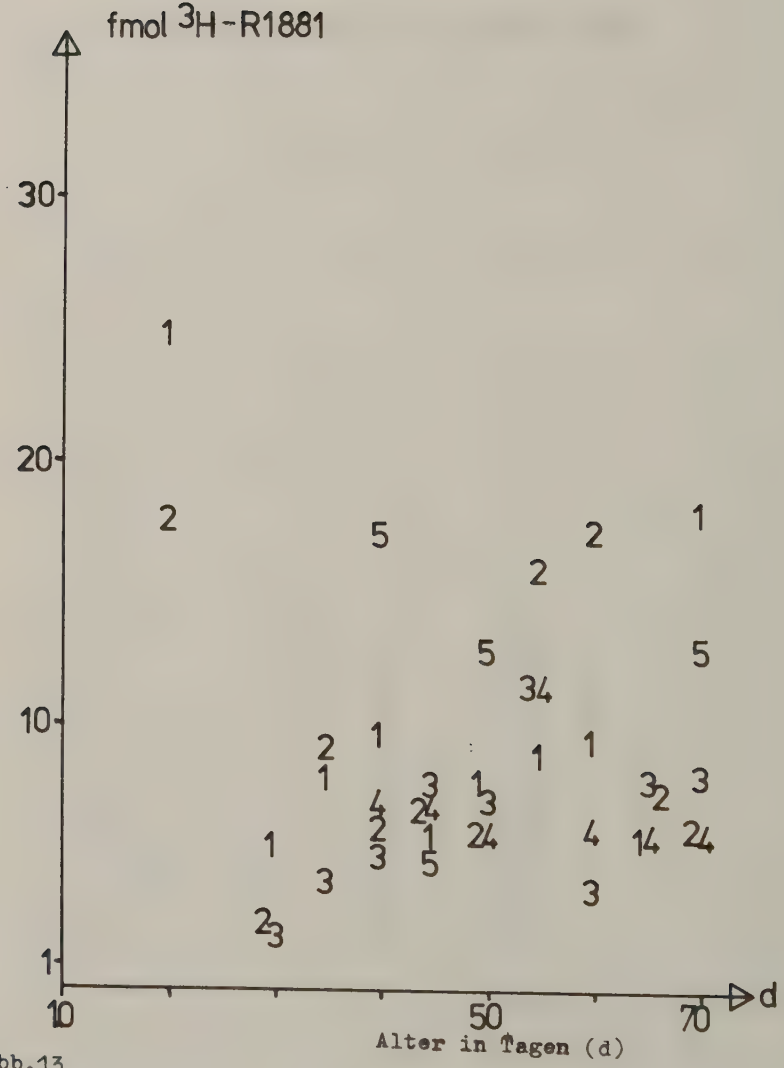


Abb.13
Diagramm zu 4.10.2.
"Steroidrezeptorkomplex zur Zeit t = 0 ($S\text{-}R_o$)."

4.11. Rezeptor zur Zeit der Inkubation (t = s)

4.11.1. Steroidrezeptorkomplex zur Zeit t = s ($S\text{-}R_s$)

Es gilt die Gleichung:

$$S\text{-}R_s = 0{,}927 \times S\text{-}R_o \quad (4.10.2.)$$

I	II	III	Wert (fmol ^{3}H-R 1881	I	II	III	Wert (fmol ^{3}H-R 1881)
1	1	20	22,72	21	3	50	6,57
2	2		16,23	22	4		5,42
3	1	30	5,11	23	5		11,71
4	2		2,21	24	1	55	8,27
5	3		1,82	25	2		14,45
6	1	35	7,37	26	3		10,61
7	2		8,47	27	4		10,51
8	3		3,98	28	1	60	8,68
9	1	40	8,99	29	2		14,06
10	2		5,83	30	3		3,62
11	3		4,75	31	4		5,65
12	4		6,53	32	1	65	5,21
13	5		15,86	33	2		6,96
14	1	45	5,5	34	3		7,38
15	2		6,41	35	4		5,41
16	3		7,12	36	1	70	16,71
17	4		6,51	37	2		5,74
18	5		4,5	38	3		7,67
19	1	50	7,32	39	4		5,35
20	2		5,21	40	5		11,78

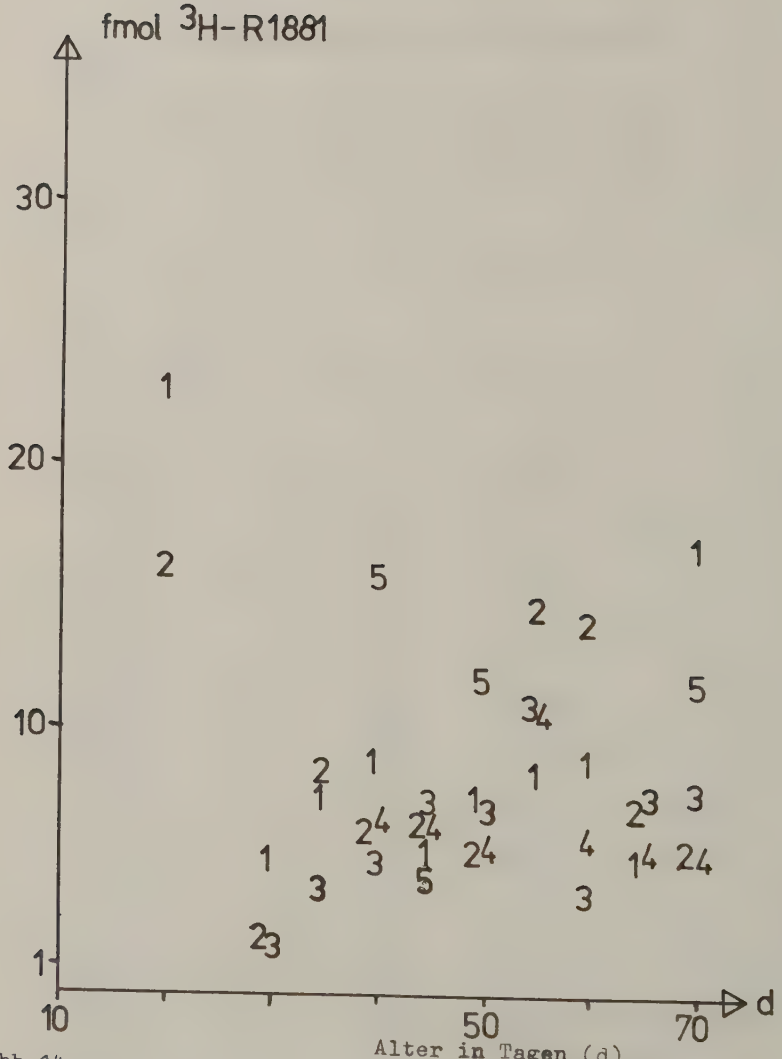


Abb.14

Diagramm zu 4.11.1.

"Steroidrezeptorkomplex zur Zeit t = s ($S-R_s$)."

4.11.2. Freier Rezeptor zur Zeit t = s (fR_s)

Es gilt die Gleichung:

$$fR_s = 0{,}522 \times fR_o + 0{,}057 \times S\text{-}R_s$$

I	II	III	Wert (fmol ^{3}H-R 1881)	I	II	III	Wert (fmol ^{3}H-R 1881)
1	1	20	3,17	21	3	50	1,89
2	2		2.05	22	4		2,26
2	1	30	1,85	23	5		1,95
4	2		1,18	24	1	55	2,13
5	3		2,17	25	2		2,43
6	1	35	5,78	26	3		2,25
7	2		3,79	27	4		2,15
8	3		4,58	28	1	60	2,77
9	1	40	1,39	29	2		3,57
10	2		1,41	30	3		2,77
11	3		3,36	31	4		3,52
12	4		2,05	32	1	65	2,36
13	5		3,18	33	2		2,85
14	1	45	1,76	34	3		2,52
15	2		1,76	35	4		1,99
16	3		1,8	36	1	70	4,76
17	4		2,39	37	2		4,13
18	5		1,67	38	3		2,46
19	1	50	1,96	39	4		3,24
20	2		2,81	40	5		4,91

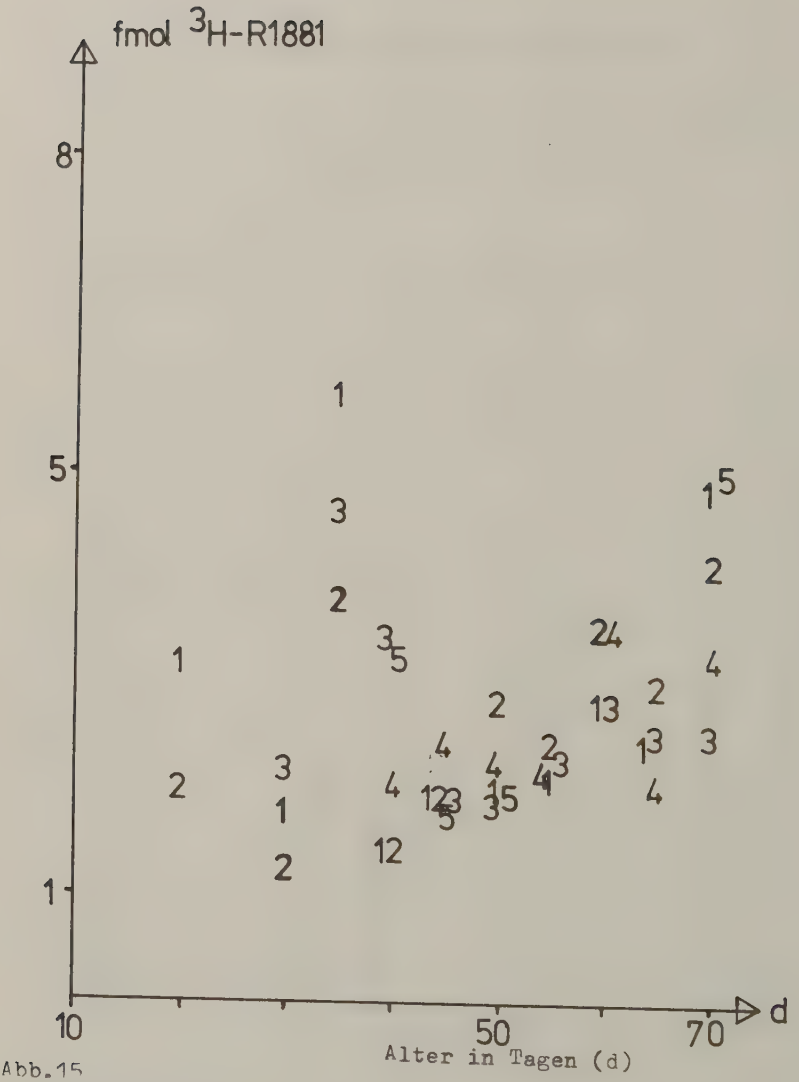


Abb.15

Diagramm zu 4.11.2.

"Freier Rezeptor zur Zeit t = s (fR_s)."

4.12. Supprimierbare Bindung je mg Protein zu den Inkubationszeiten t_1 = 1 Stunde und t_2 = 48 Stunden

Es gelten folgende Gleichungen:

a) für t_1 = Stunde:

$$\frac{(4.8.) \times 100}{(4.3.1.)} = \text{Wert nach 1 h Inkubation}$$

b) für t_2 = 48 Stunden:

$$\frac{(4.9.) \times 100}{(4.3.1.)} = \text{Wert nach 48 h Inkubation}$$

I	II	III	Wert (fmol ^{3}H-R 1881) für t_1	für t_2
1	1	20	10,98	57,48
2	2		7,28	42,76
3	1	30	8,52	19,52
4	2		5,65	10,28
5	3		9,52	12,4
6	1	35	17,2	26,05
7	2		11,14	22,33
8	3		16,08	21,2
9	1	40	5,55	25,9
10	2		5,51	17,09
11	3		11,92	18,87
12	4		6,39	16,16
13	5		9,99	36,39

I	II	III	Wert (fmol ^{3}H-R 1881) für t_1	für t_2
14	1	45	7,09	17,69
15	2		7,53	21,02
16	3		6,56	19,56
17	4		8,27	18,75
18	5		5,43	12,22
19	1	50	6,53	18,58
20	2		9,71	17,53
21	3		5,79	15,7
22	4		7,75	16,2
23	5		6,31	27,3
24	1	55	6,76	19,85
25	2		6,4	27,51
26	3		7,34	25,38
27	4		5,67	20,28
28	1	60	7,14	17,85
29	2		11,7	34,76
30	3		9,25	14,79
31	4		11,79	19,82
32	1	65	7,26	14,42
33	2		8,2	17,33
34	3		7,51	17,85
35	4		6,88	15,55
36	1	70	17,42	47,29
37	2		14,53	22,85
38	3		6,25	15,57
39	4		9,44	16,06
40	5		8,14	29,17

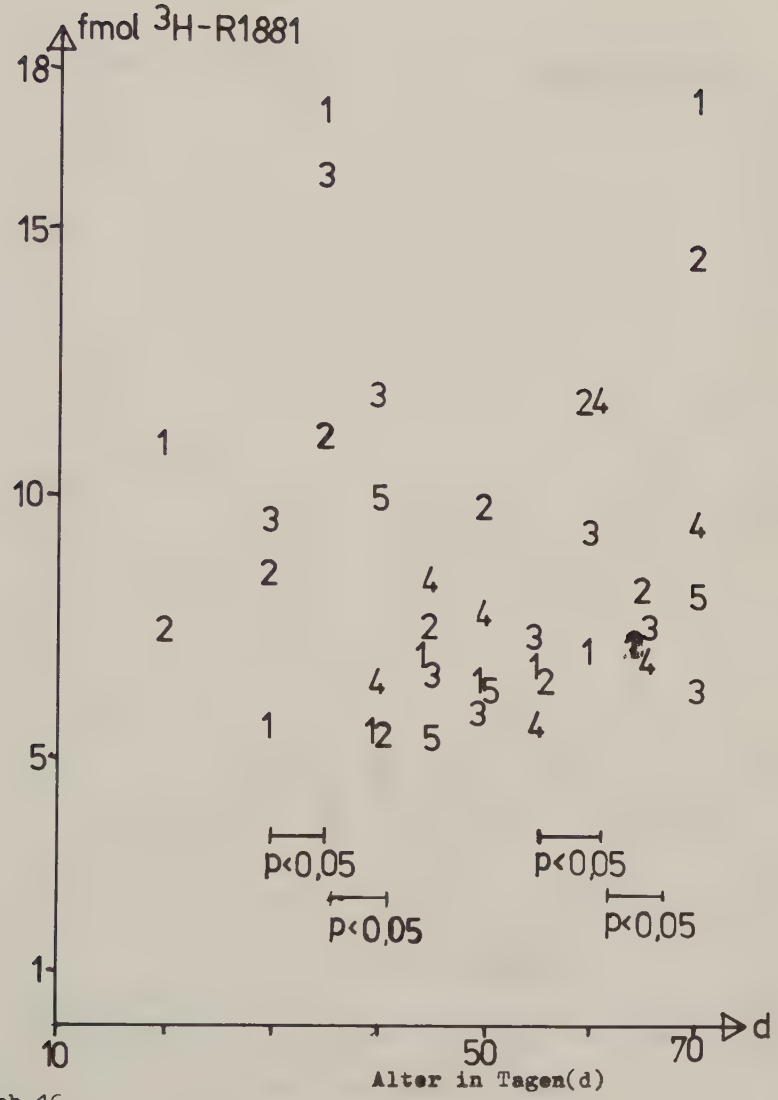


Abb.16

Diagramm zu 4.12.a.

"Supprimierbare Bindung je mg Protein zu der Inkubationszeit 1 Stunde."

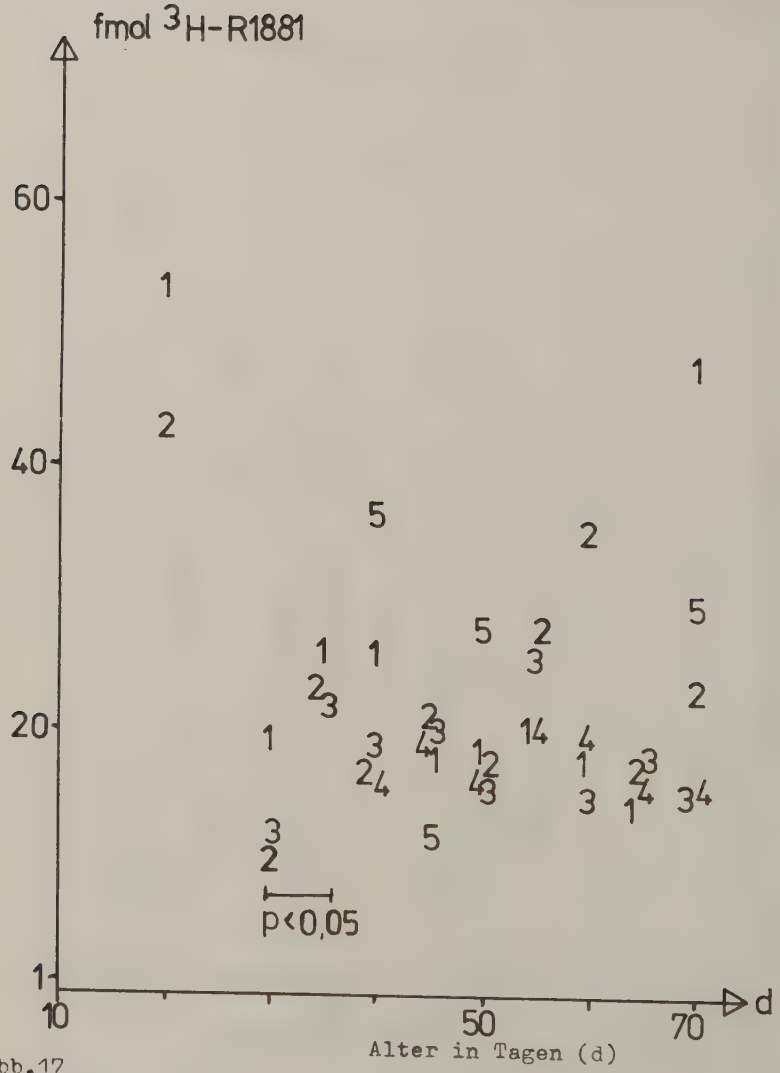


Abb.17
Diagramm zu 4.12.b.
"Suppromierbare Bindung je mg Protein zu der Inkubationszeit 48 Stunden."

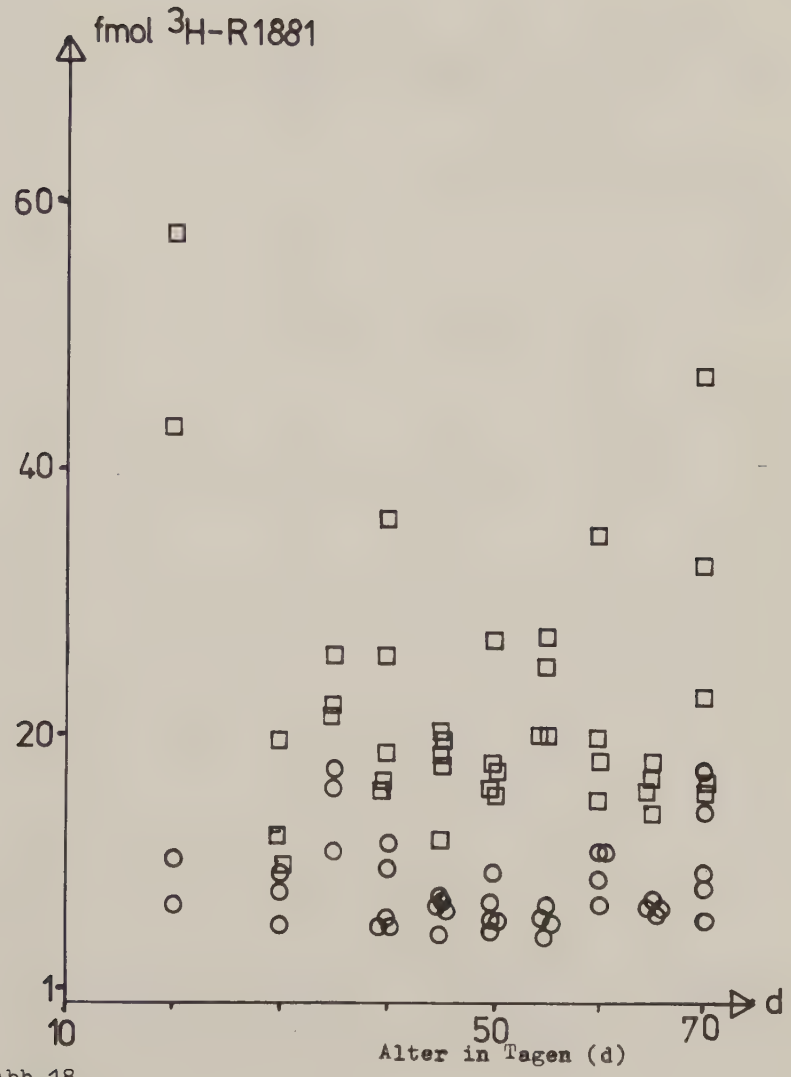


Abb.18

Diagramm zu 4.12.

"Supprimierbare Bindung je mg Protein zu den Inkubationszeiten t_1 = 1 Stunde (○) und t_2 = 48 Stunden (□)."

4.13. Supprimierbare Bindung pro Tier (mol/Tier) zu den Inkubationszeiten t_1 = 1 Stunde und t_2 = 48 Stunden

Es gelten folgende Gleichungen:

a) t_1 = 1 Stunde:

$$\frac{(4.8.) \times 1}{25} = \text{Wert nach 1 h Inkubation}$$

b) t_2 = 48 Stunden:

$$\frac{(4.9.) \times I}{25} = \text{Wert nach 48 h Inkubation}$$

I	II	III	Wert (fmol ^{3}H-R 1881) für t_1	für t_2
1	1	20	4,27	19,97
2	2		2,66	15,63
3	1	30	5,88	21,54
4	2		5,31	9,66
5	3		9,34	12,17
6	1	35	33,76	51,15
7	2		20,15	40,39
8	3		26,69	35,32
9	1	40	9,75	45,5
10	2		11,21	34,78
11	3		32,76	51,86
12	4		11,37	28,74
13	5		17,34	63,14

I	II	III	Wert (fmol ^{3}H-R 1881) für t_1	für t_2
14	1	45	12,45	31,1
15	2		11,76	32,59
16	3		11,76	35,07
17	4		19,55	44,35
18	5		12,06	27,15
19	1	50	21,12	60,13
20	2		31,22	56,39
21	3		23,84	64,56
22	4		30	62,72
23	5		16,74	72,42
24	1	55	34,97	102,59
25	2		34,7	149,2
26	3		40,68	140,76
27	4		38,52	137,76
28	1	60	62,3	155,82
29	2		59,31	176,24
30	3		45,87	73,4
31	4		80,13	134,65
32	1	65	68,46	136,1
33	2		94,4	199,6
34	3		76,54	182,01
35	4		61,04	137,93
36	1	70	140,94	382,69
37	2		120,87	190,66
38	3		59,4	147,9
39	4		88,48	150,56
40	5		103,22	215,94

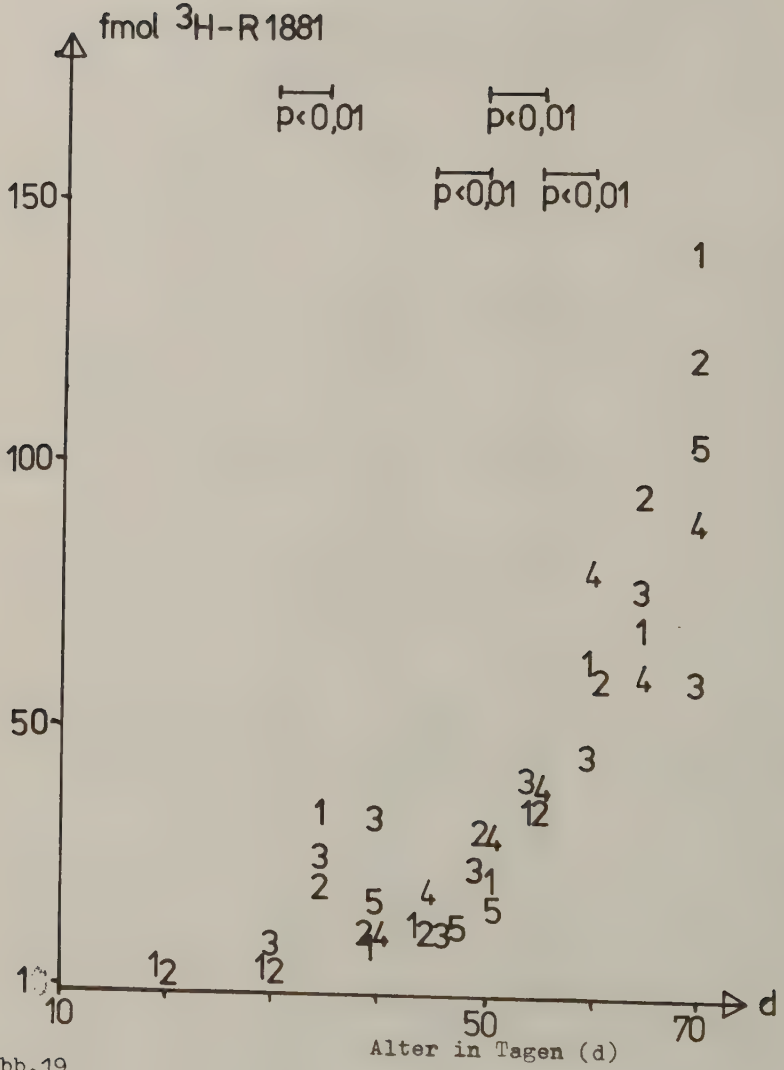


Abb.19

Diagramm zu 4.13.a.

"Supprimierbare Bindung pro Tier (mol/Tier) zu der Inkubationszeit 1 Stunde."

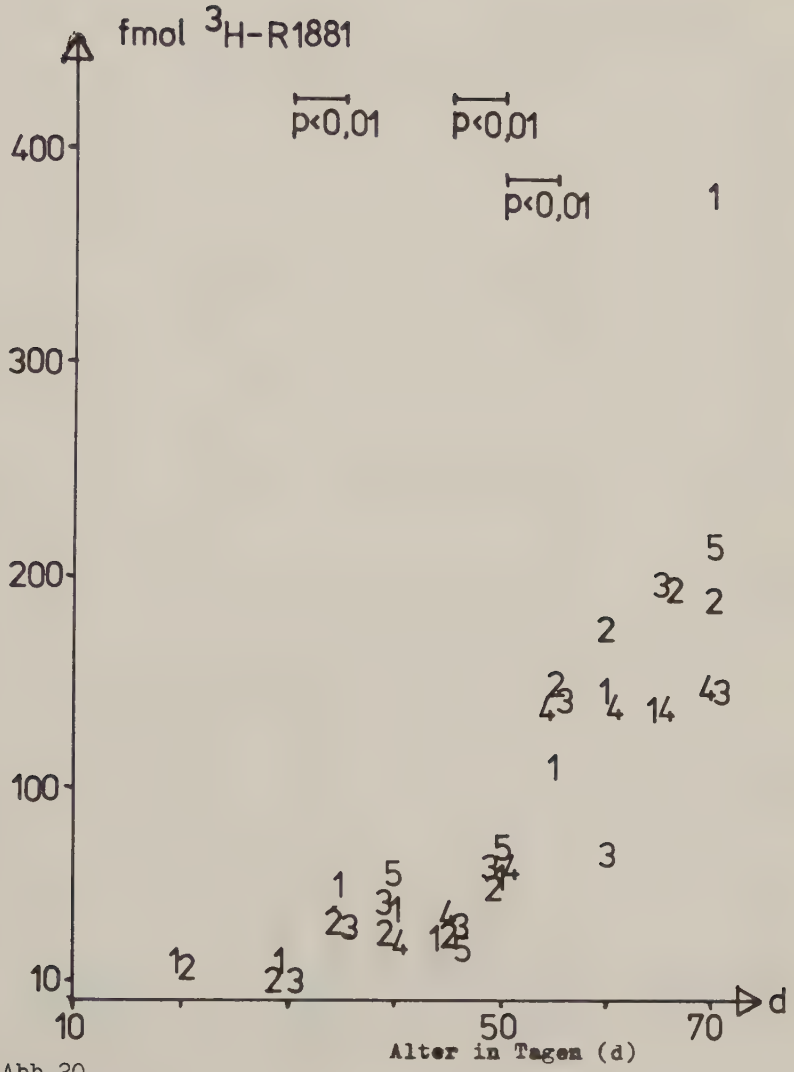


Abb.20
Diagramm zu 4.13.b.
"Supprimierbare Bindung pro Tier (mol/Tier) zu der Inkubationszeit 48 Stunden."

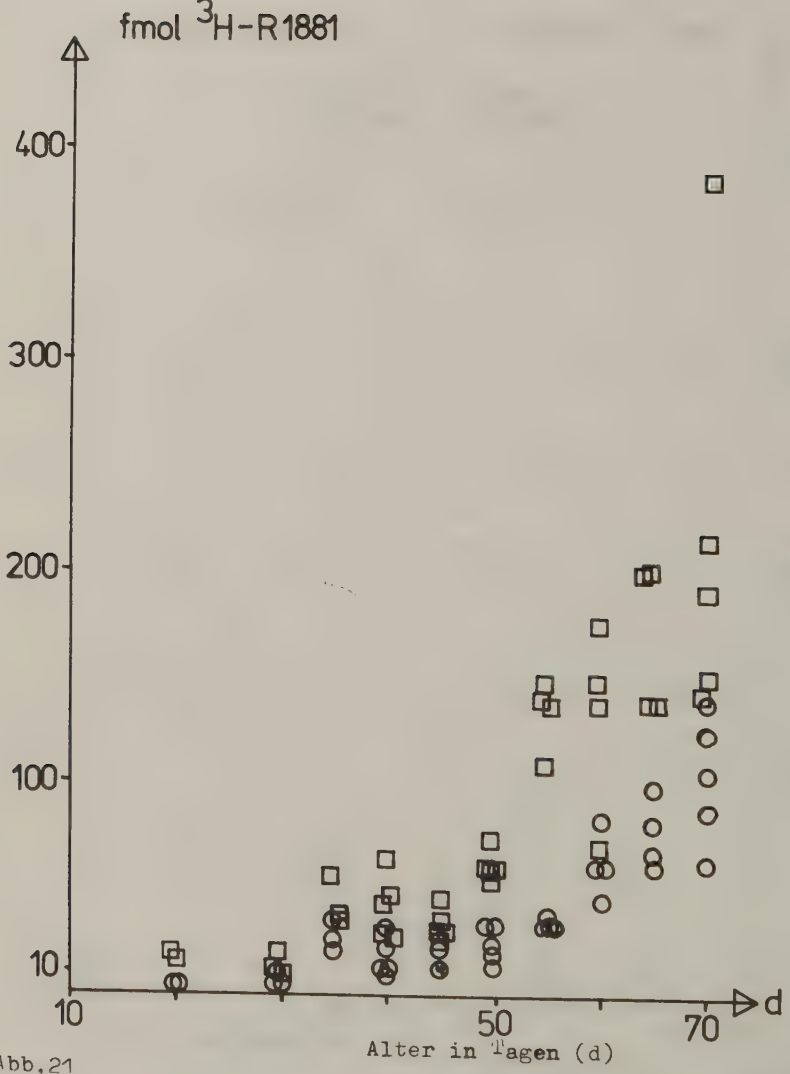


Abb.21

Diagramm zu 4.13.

"Supprimierbare Bindung pro Tier (mol/Tier) zu den Inkubationszeiten t_1 = 1 Stunde und t_2 = 48 Stunden(□)."

4.14. ^{3}H-R 1881 Bindung pro DNA (mol/mg) zu den Inkubationszeiten t_1 und t_2

Es gelten folgende Gleichungen:

a) für t_2 = 1 Stunde:

$$\frac{(4.13.t_1)}{(4.5.)} = \text{Wert nach 1 h Inkubation}$$

b) für t_2 = 48 Stunden:

$$\frac{(4.13.t_2)}{(4.5.)} = \text{Wert nach 48 h Inkubation}$$

I	II	III	Wert (fmol ^{3}H-R 1881) für t_1	für t_2
1	1	20	99,58	465,83
2	2		73,18	429,86
3	1	30	80,31	294,32
4	2		72,56	131,99
5	3		104,98	136,86
6	1	35	325,84	493,64
7	2		229,84	460,78
8	3		247,7	326,74
9	1	40	91,74	428,11
10	2		106,33	329,8
11	3		200,34	317,14
12	4		115,74	292,59
13	5		144,61	526,48

I	II	III	Wert (fmol ^{3}H-R 1881) für t_1	für t_2
14	1	45	100,83	251,55
15	2		99,11	274,67
16	3		125,64	374,68
17	4		178	403,81
18	5		86,74	195,32
19	1	50	146,73	417,81
20	2		247,62	447,28
21	3		123,75	335,12
22	4		142,39	297,69
23	5		79,86	345,5
24	1	55	194,03	569,28
25	2		117,73	506,19
26	3		102,31	354,02
27	4		86,48	309,27
28	1	60	156,33	391,51
29	2		218,11	648,07
30	3		187,56	300,1
31	4		240,59	404,32
32	1	65	110,33	219,27
33	2		158,54	335,22
34	3		124,17	295,29
35	4		99,05	223,77
36	1	70	378,04	1026,46
37	2		659,2	1036,54
38	3		100,34	249,84
39	4		163,91	278,91
40	5		237,71	497,31

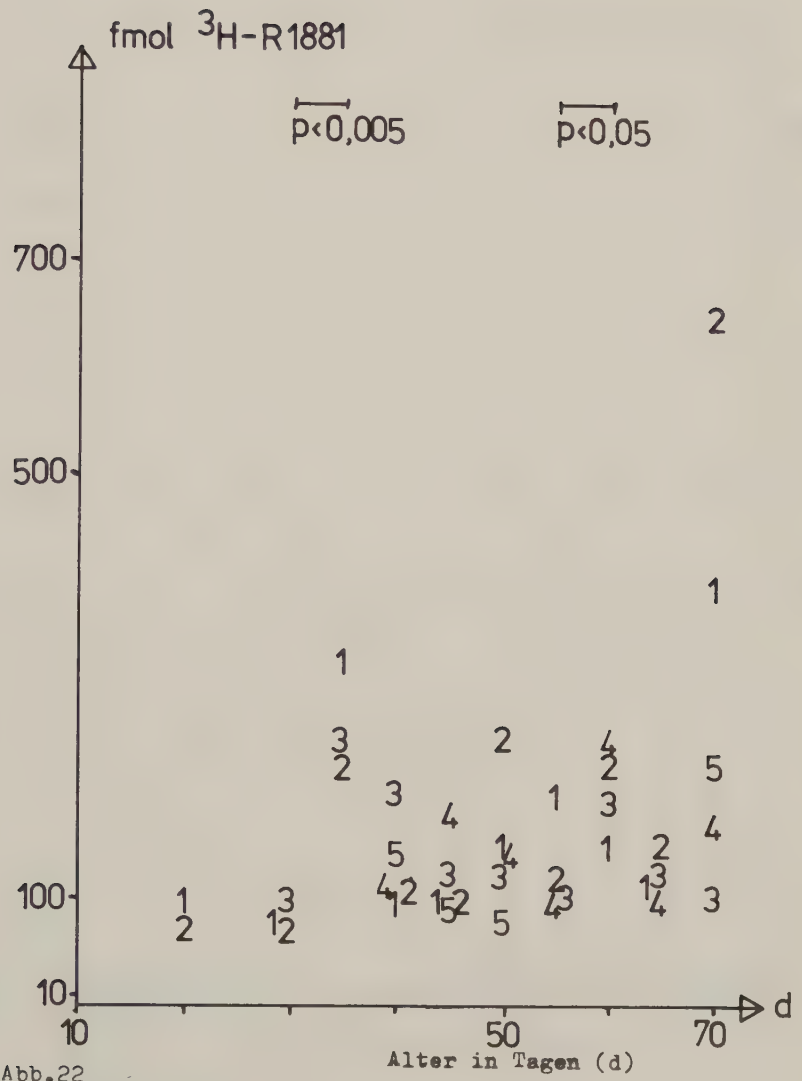


Abb.22

Diagramm zu 4.14.a.

"^{3}H-R 1881 Bindung pro DNA (mol/mg) zu der Inkubationszeit 1 Stunde."

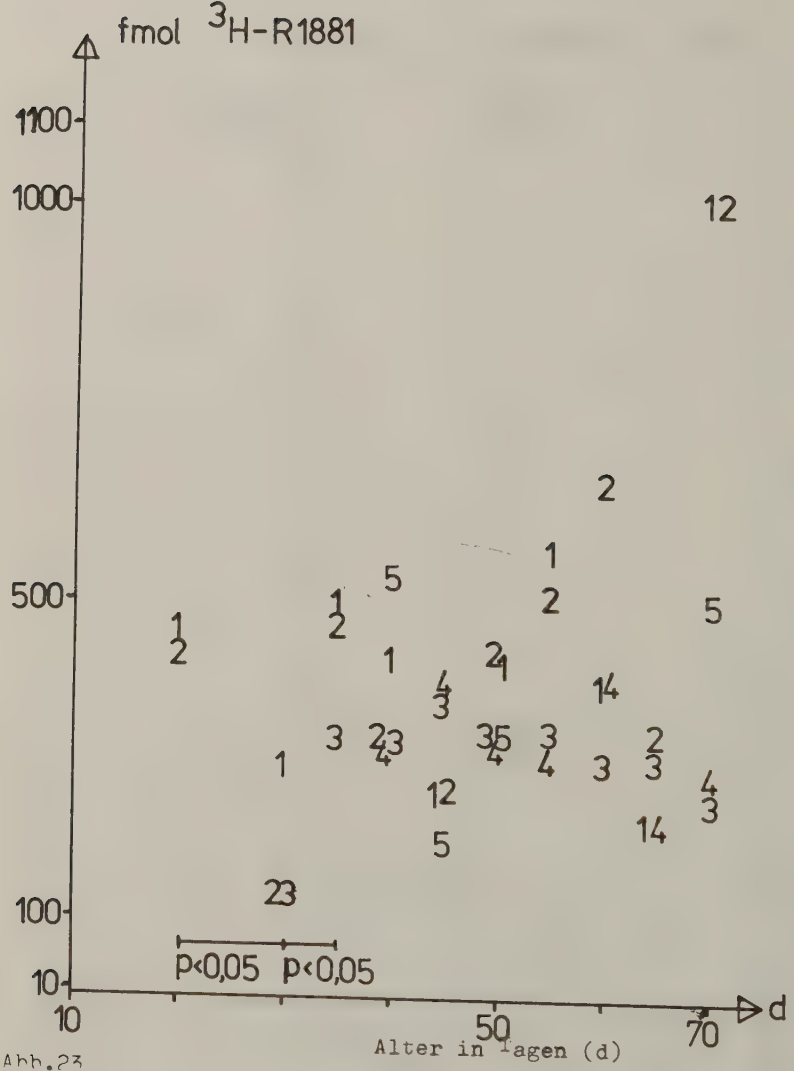


Abb.23

Diagramm zu 4.14.b.
"^{3}H-R 1881 Bindung pro DNA (mol/mg) zu der Inkubations-
zeit 48 Stunden."

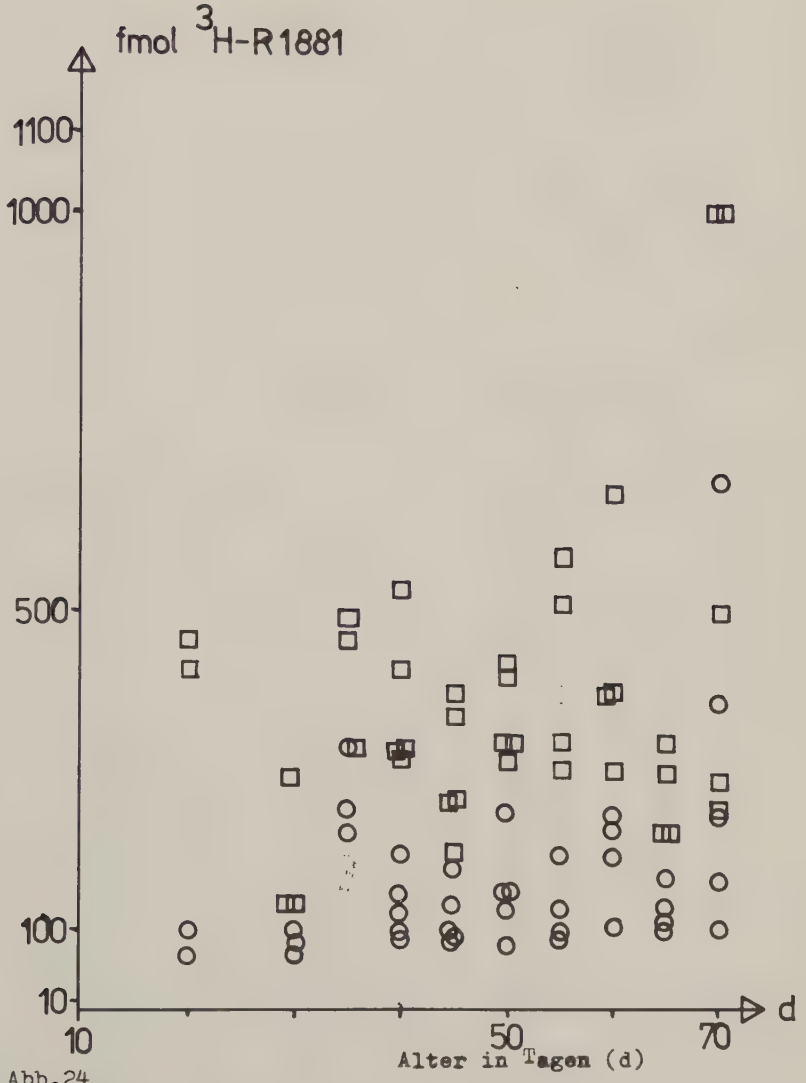


Abb.24

Diagramm zu 4.14.

"^{3}H-R 1881 Bindung pro DNA (mol/mg) zu den Inkubationszeiten t_1 = 1 Stunde (○) und t_2 = 48 Stunden (□)."

4.15. Bindung pro mg DNA zu den Zeiten t_o und t_s

4.15.1. Bindung für den freien Rezeptor

4.15.1.1. zur Zeit t = o

Es gilt die Gleichung:

$$\frac{fR_0 \text{ (4.10.1.)} \times 2000}{\text{DNA in mg (4.4.)}} = \text{Bindung } fR_0$$

I	II	III	Wert (fmol ^{3}H-R 1881)	I	II	III	Wert (fmol ^{3}H-R 1881)
1	1	20	83,99	21	3	50	128,14
2	2		70,97	22	4		171,17
3	1	30	134,96	23	5		89,22
4	2		82,41	24	1	55	141,18
5	3		133,6	25	2		114,95
6	1	35	369,28	26	3		102,99
7	2		280,22	27	4		86,68
8	3		308,49	28	1	60	169,39
9	1	40	87,45	29	2		185,5
10	2		110,69	30	3		183,72
11	3		217,21	31	4		211,32
12	4		142,6	32	1	65	123,32
13	5		173,91	33	2		174,03
14	1	45	127,86	34	3		135,12
15	2		119,7	35	4		91,84
16	3		148,33	36	1	70	404,66
17	4		211,42	37	2		529,07
18	5		111,13	38	3		143,81
19	1	50	152,77	39	4		187,73
20	2		272,52	40	5		274,28

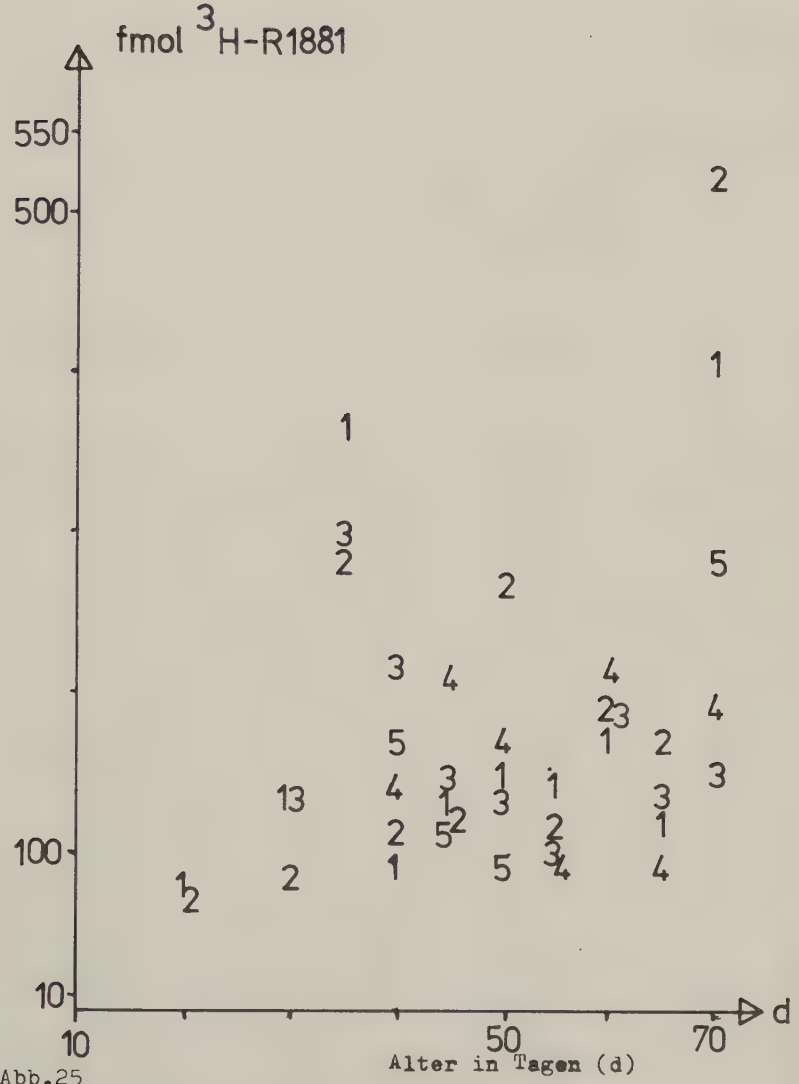


Abb.25
Diagramm zu 4.15.1.1.
"Bindung pro mg DNA für fR_0."

4.15.1.2. zur Zeit t = s

Es gilt die Gleichung:

$$\frac{fR_s \text{ (4.11.2.)} \times 2000}{\text{DNA in mg (4.4.)}} = \text{Bindung } fR_s$$

I	II	III	Wert (fmol ^{3}H-R 1881)	I	II	III	Wert (fmol ^{3}H-R 1881)
1	1	20	73,96	21	3	50	84,09
2	2		67,67	22	4		103,43
3	1	30	83,79	23	5		70,44
4	2		48,38	24	1	55	94,56
5	3		73,21	25	2		90,69
6	1	35	202,2	26	3		73,57
7	2		167,51	27	4		62,57
8	3		169,41	28	1	60	107,87
9	1	40	71,92	29	2		124,72
10	2		75,77	30	3		102,71
11	3		123,28	31	4		121,55
12	4		91,07	32	1	65	73,53
13	5		126,84	33	2		105,3
14	1	45	81,24	34	3		84,49
15	2		78,61	35	4		56,41
16	3		100	36	1		236,86
17	4		130,57	37	2		300,15
18	5		68,51	38	3		91,42
19	1	50	101,16	39	4		108,04
20	2		163,23	40	5		165,85

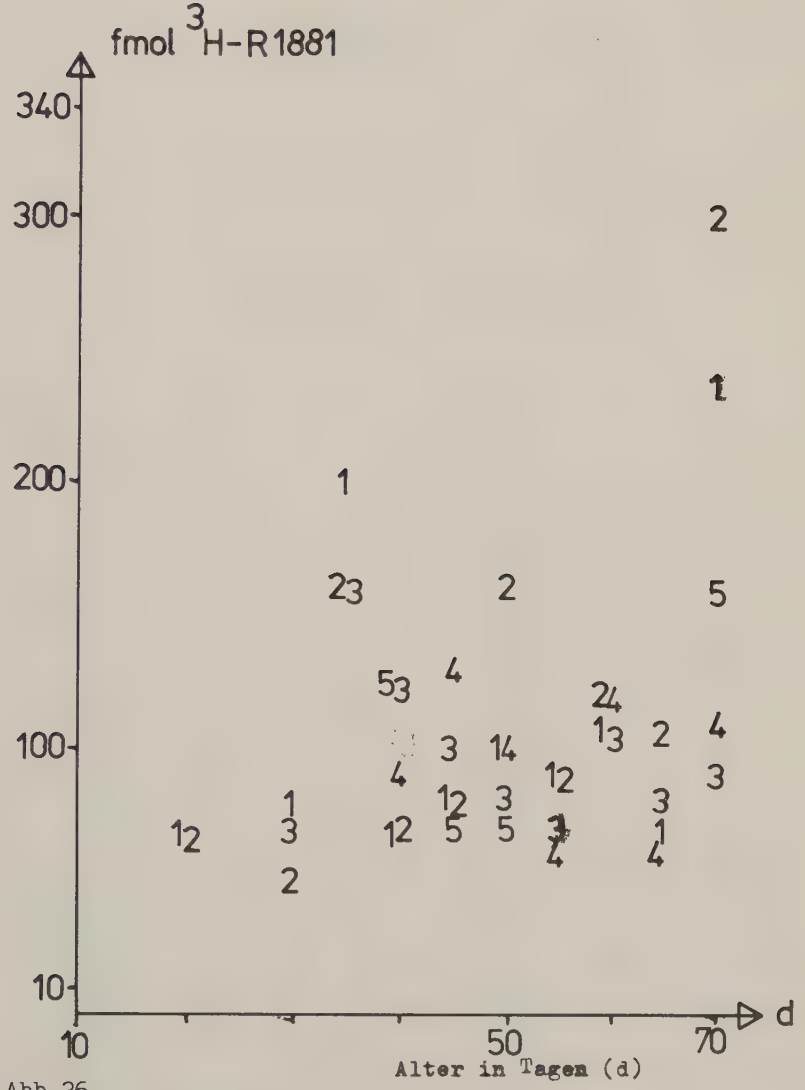


Abb.26
Diagramm zu 4.15.1.2.
"Bindung pro mg DNA für fR_s."

4.15.2. Bindung für den Steroidrezeptorkomplex

4.15.2.1. zur Zeit t = o

Es gilt die Gleichung:

$$\frac{S\text{-}R_o \text{ (4.10.2.)} \times 2000}{\text{DNA in mg (4.4.)}} = \text{Bindung } S\text{-}R_o$$

I	II	III	Wert (fmol ^{3}H-R 1881)	I	II	III	Wert (fmol ^{3}H-R 1881)
1	1	20	571,89	21	3	50	315,37
2	2		577,95	22	4		267,64
3	1	30	249,73	23	5		456,1
4	2		97,83	24	1	55	395,96
5	3		66,36	25	2		581,56
6	1	35	278,26	26	3		374,27
7	2		403,71	27	4		330,77
8	3		158,94	28	1	60	364,56
9	1	40	502,30	29	2		529,85
10	2		338,21	30	3		155
11	3		178,82	31	4		210,6
12	4		312,93	32	1	65	175,04
13	5		682,25	33	2		277,41
14	1	45	273,76	34	3		266,79
15	2		309,07	35	4		165,33
16	3		426,56	36	1	70	999,5
17	4		383,45	37	2		450,36
18	5		199,26	38	3		307,43
19	1	50	407,54	39	4		192,33
20	2		318,13	40	5		429,29

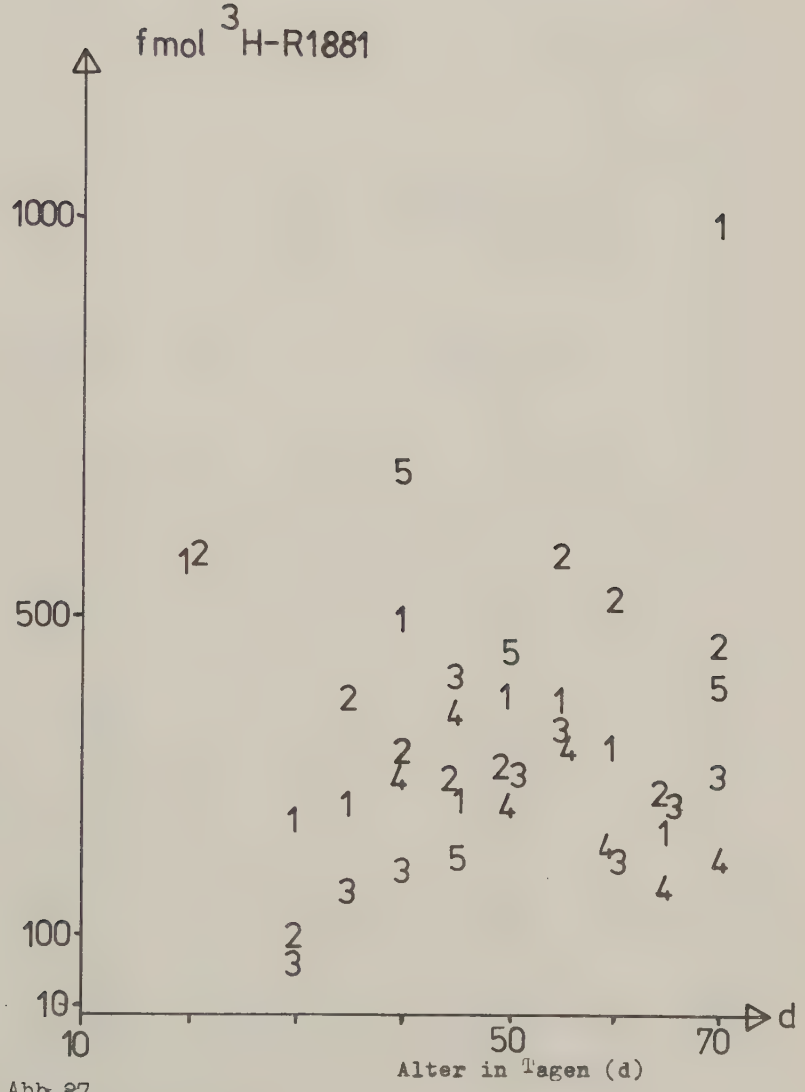


Abb.27

Diagramm zu 4.15.2.1.

"Bindung pro mg DNA für S-R_o."

4.15.2.2. zur Zeit t = s

Es gilt die Gleichung:

$$\frac{S\text{-}R_s \text{ (4.11.1.) x 2000}}{\text{DNA in mg (4.4.)}} = \text{Bindung } S\text{-}R_s$$

I	II	III	Wert (fmol ^{3}H-R 1881)	I	II	III	Wert (fmol ^{3}H-R 1881)
1	1	20	530,1	21	3	50	292,32
2	2		535,73	22	4		248,05
3	1	30	231,43	23	5		422,97
4	2		90,61	24	1	55	367,15
5	3		62,4	25	2		539,28
6	1	35	257,83	26	3		346,9
7	2		374,36	27	4		306,73
8	3		147,22	28	1	60	338,01
9	1	40	465,2	29	2		491,18
10	2		313,27	30	3		140,61
11	3		174,28	31	4		195,1
12	4		290,09	32	1	65	162,33
13	5		632,63	33	2		257,16
14	1	45	254,87	34	3		247,44
15	2		286,29	35	4		153,34
16	3		395,56	36	1	70	926,27
17	4		355,64	37	2		417,15
18	5		184,54	38	3		285,02
19	1	50	377,81	39	4		178,39
20	2		295,18	40	5		397,91

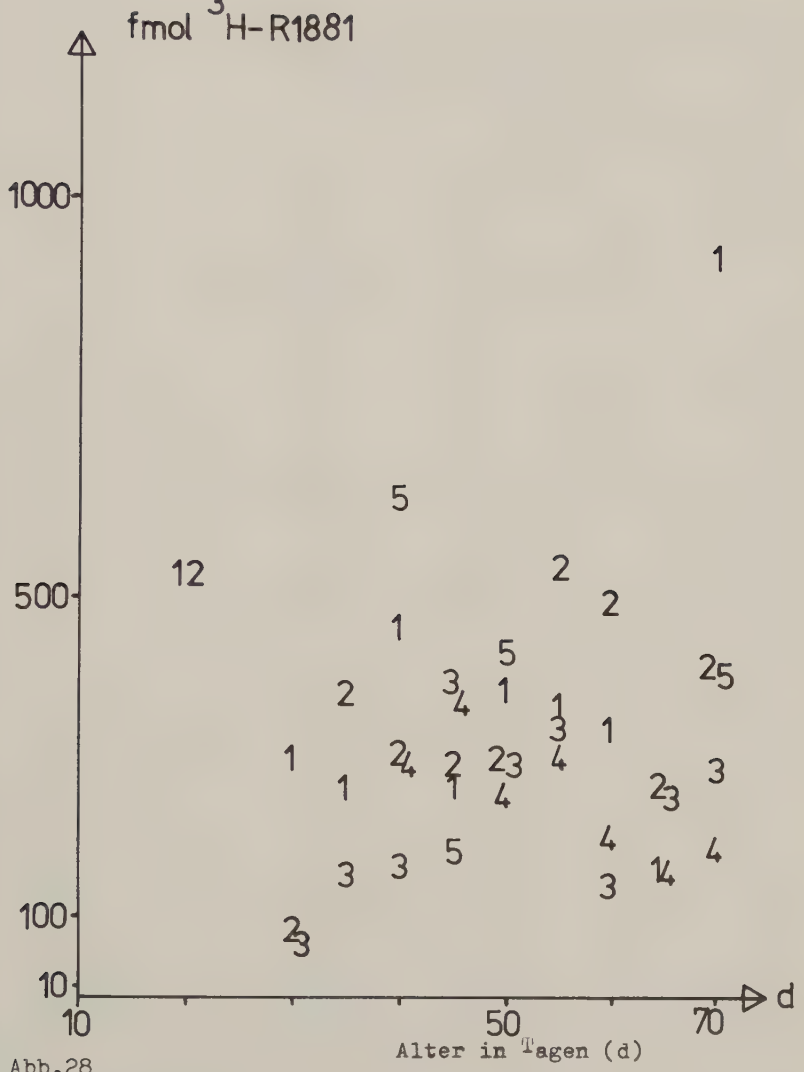


Abb.28

Diagramm zu 4.15.2.2.

"Bindung pro mg DNA für S-R_s."

4.16. fmol ^{3}H-R 1881 pro mg Prostata zu den Inkubationszeiten t_1 und t_2

Es gelten folgende Gleichungen:

a) für t_1 = 1 Stunde:

$$\frac{(4.13.t_1)}{G} = \text{Wert nach 1 h Inkubation}$$

b) für t_2 = 48 Stunden:

$$\frac{(4.13.t_2)}{G} = \text{Wert nach 48 h Inkubationen}$$

I	II	III	Wert (fmol ^{3}H-R 1881) für t_1	für t_2
1	1	20	0,41	1,94
2	2		0,25	1,49
3	1	30	0,21	0,77
4	2		0,2	0,37
5	3		0,36	0,47
6	1	35	0,86	1,31
7	2		0,58	1,16
8	3		0,79	1,05
9	1	40	0,21	0,97
10	2		0,23	0,72
11	3		0,63	1,0
12	4		0,3	0,77
13	5		0,43	1,59

I	II	III	Wert (fmol ^{3}H-R 1881) für t_1	für t_2
14	1	45	0,26	0,66
15	2		0,26	0,73
16	3		0,27	0,81
17	4		0,38	0,87
18	5		0,25	0,57
19	1	50	0,32	0,92
20	2		0,49	0,9
21	3		0,33	0,89
22	4		0,36	0,76
23	5		0,26	1,12
24	1	55	0,37	1,08
25	2		0,37	1,58
26	3		0,36	1,24
27	4		0,34	1,22
28	1	60	0,42	1,05
29	2		0,5	1,49
30	3		0,39	0,63
31	4		0,57	0,96
32	1	65	0,43	0,86
33	2		0,48	1,03
34	3		0,42	1,01
35	4		0,36	0,81
36	1	70	0,93	2,53
37	2		0,76	1,2
38	3		0,35	0,88
39	4		0,54	0,91
40	5		0,76	1,59

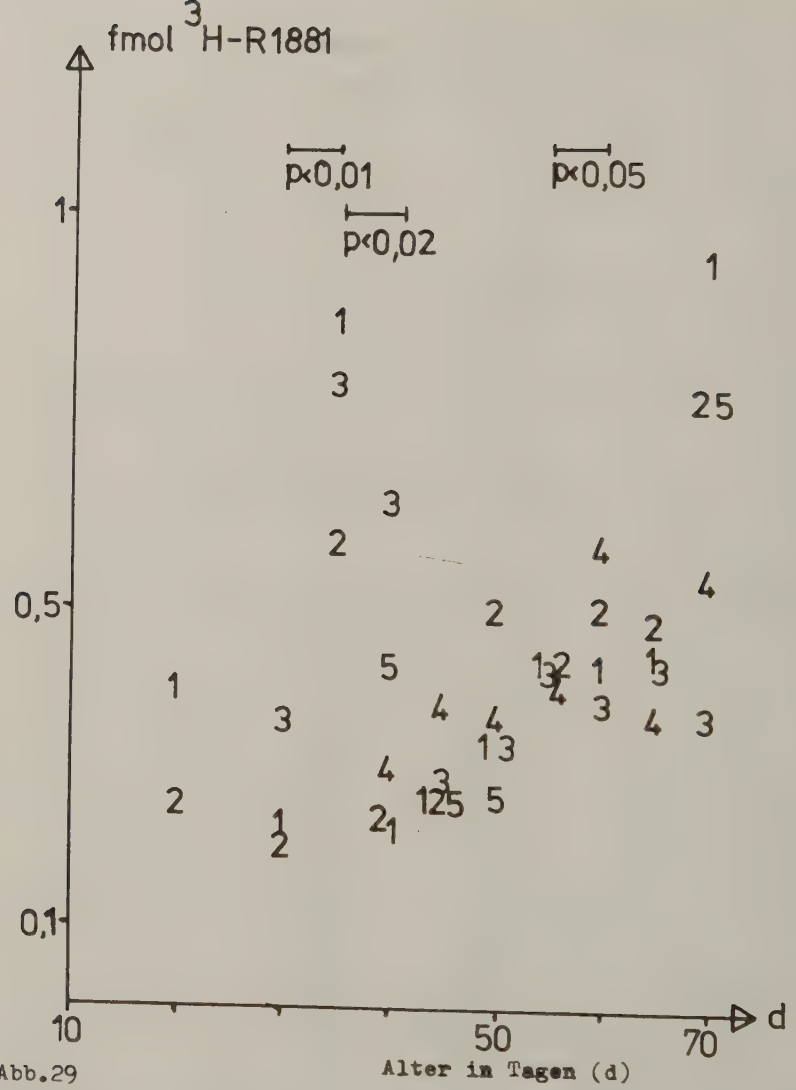


Abb.29

Diagramm zu 4.16.a.
"fmol ^{3}H-R 1881 pro mg Prostata zu der Inkubationszeit 1 Stunde."

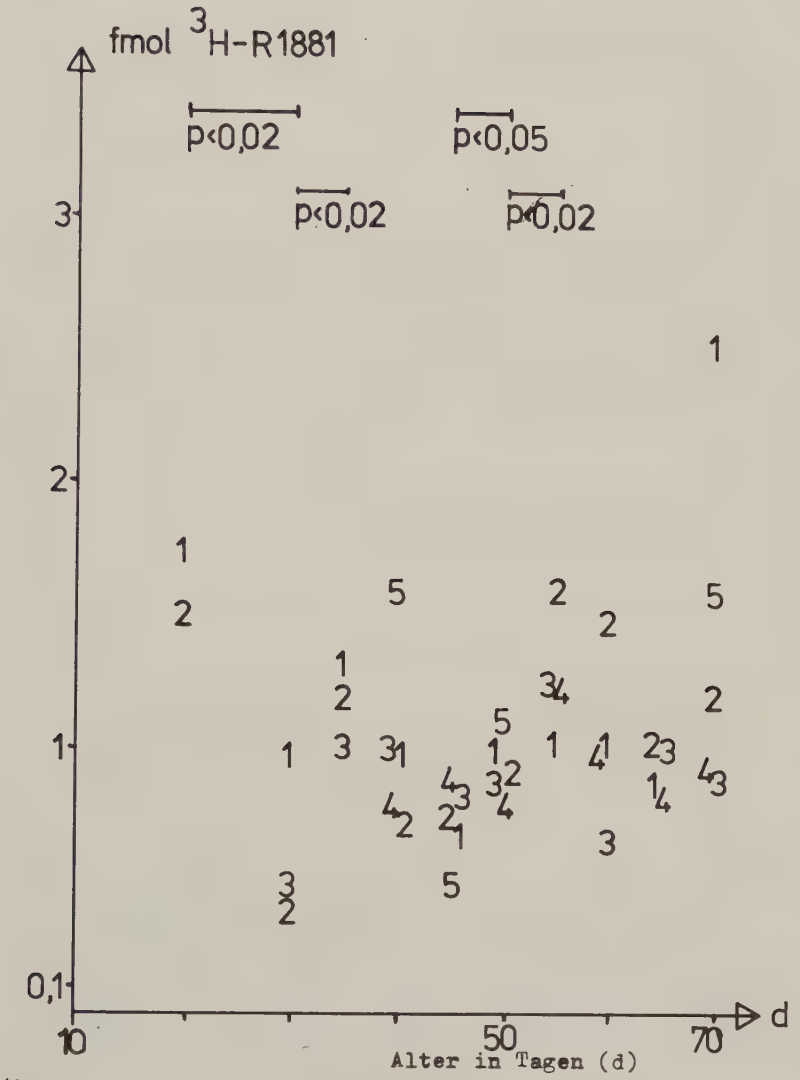


Abb.30

Diagramm zu 4.16.b.

"fmol ^{3}H-R 1881 pro mg Prostata zu der Inkubationszeit 48 Stunden."

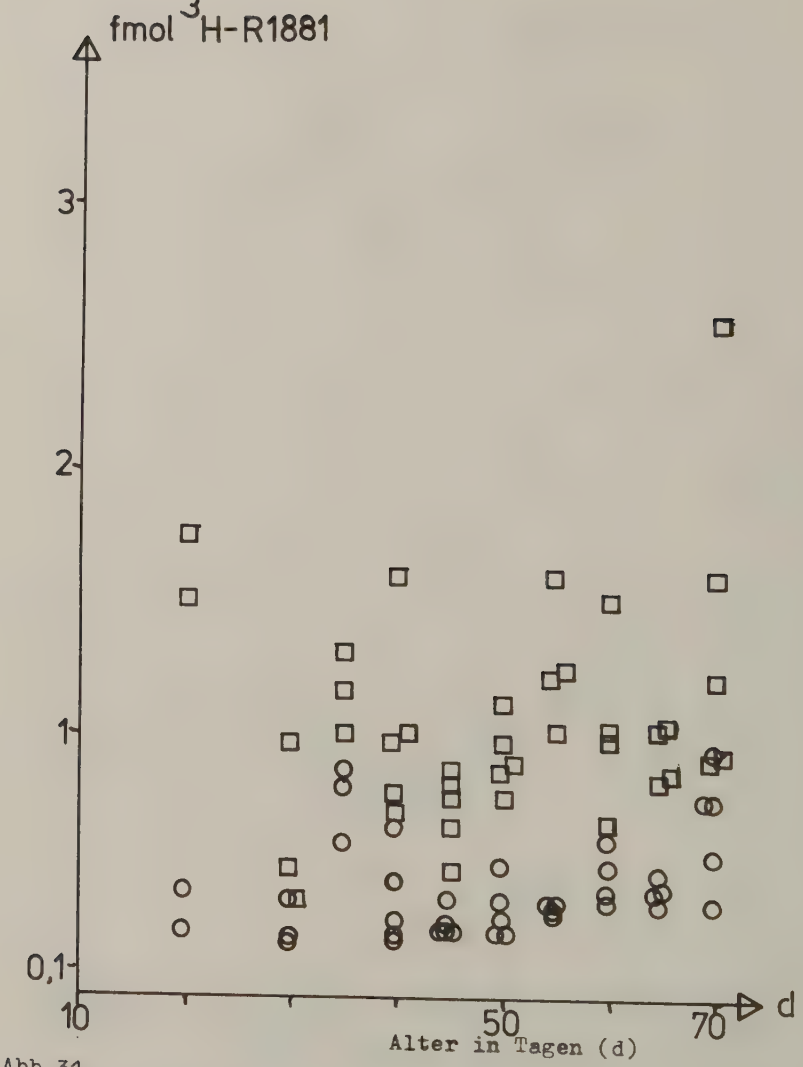


Abb.31

Diagramm zu 4.16.

"fmol ^{3}H-R 1881 pro mg Prostata zu den Inkubationszeiten t_1 = 1 Stunde (○) und t_2 = 48 Stunden (□).

5. DISKUSSION

5.1. Tiere

Da die Versuchstiere nicht im eigenen Labor aufgezogen, sondern bei einer Firma eingekauft wurden, besteht eine gewisse Unsicherheit im genauen Alter der Tiere. Diese Unsicherheit zeigt sich vor allem im Gewicht der Tiere. So wogen 65 Tage alte Tiere durchschnittlich 195 g (Firmenwert: 175 - 185 g) und 70 Tage alte Tiere besaßen ein Gewicht von durchschnittlich 178 g (Firmenangabe: 220 - 230 g). Dieser Gewichtsunterschied wirkt sich bei sämtlichen Versuchsreihen aus.

Tabelle Nr. 1:

Alter (d)	Gewicht (g)			
	eigene Messung		Firmenangabe	
	von - bis	Ø	von - bis	Ø
20	17 - 26	23,3		30
30	38 - 51	42,5		57,5
40	82 -105	98,5		96,5
50	100 -130	118,4		135
60	160 -192	174,5	175 - 185	182
65	175 -210	195	200 - 215	210
70	170 -200	178	220 - 230	226

Diagramm zu obiger Tabelle:

eigene Messung: ----------
Firmenangabe: ....

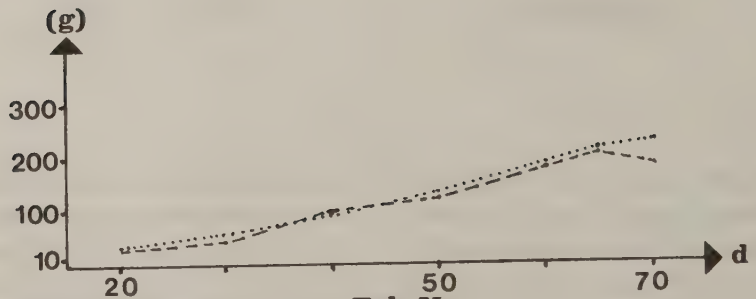


Abb. 32: Diagramm zur Tab. Nr. 1

5.2. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde modifiziert nach Schaffner und Weissmann (51) durchgeführt und nicht nach der herkömmlichen Methode nach Lowry.

Bei der herkömmlichen Methode wird die Proteinbestimmung durch große Mengen von SH-Gruppen gestört, während Amidoschwarz dadurch nicht gestört wird.

Die gemessenen Proteinwerte lagen alle im linearen Bereich der Eichkurve. Die Extinktionen lagen zwischen 0,290 (≙ 12,446 ug Protein) und 1,500 (≙ 62,876 ug Protein). Das bedeutet, daß bei einer Extinktionsänderung von 0,001 sich das Proteingewicht um 0,0417 ug ändert. Diese Empfindlichkeit der Methode genügt.

Die Eichkurve der Proteinbestimmung war zwischen 2 ug und 80 ug linear. Die eigentlichen Proteinbestimmungen lagen zwischen 12,446 ug und 62,876 ug, so daß auch die Erfassungsgrenze als genügend angesehen werden kann.

Die Gleichung der Eichkurve lautet:

$$y = - 0{,}003 + 0{,}0233\ x \qquad (r = 0{,}9977)$$

5.3. DNA-Bestimmung

Es wurde die klassische Methode nach Burton (12) in der Modifikation von Wagner R.K. und Gaues J. (64) angewandt.

Die Linearität der Standardkurve war im Bereich von 16 ug/ml bis 90 ug/ml gegeben. Die Extinktionswerte der Eichkurve lagen zwischen 0,102 und 0,405. Daraus ergibt sich pro Änderung der Extinktion um 0,001 eine Gewichtsänderung von 0,1946 ug/ml. Bei gemessenen Werten von 28,78 ug/ml bis 87,76 ug/ml kann die Empfindlichkeit als ausreichend angesehen werden.

Die Besonderheit der modifizierten DNA-Bestimmung liegt darin, daß anstellte von DNA (schlechte Urtitersubstanz) Desoxyribose als Standardsubstanz verwendet werden kann. Dies lässt eine bessere Handhabung des Versuchs zu.

Die Gleichung der Eichkurve lautet:

$$y = 1{,}7862 + 38{,}9278\ x \qquad (r = 0{,}9313)$$

5.4. Aufbewahrung der Prostata

Das ganze Organ wird bei -70°C aufbewahrt, so daß selbst über mehrere Wochen hinweg kein nennenswerter Rezeptorverlust eintritt (25,45).

5.5. Homogenisierung

Die Homogenisierung wurde mit einem Mikrodismembrator und nicht mit dem Potter-Homogenisator durchgeführt, da dieser ein Gewebe mit einem höheren Bindegewebsanteil sehr schlecht homogenisiert (62).

Dies fällt bei Versuchen mit Rattenprostaten nicht ins Gewicht, da deren Anteil an Bindegewebe gering ist.

Der Mirkodismembrator wurde aber dennoch benützt, da die Versuchsdurchführung für die verschiedensten Gewebe gleich sein sollte (44).

Vor jedem Arbeitsgang wurde die Prostata in flüssigem Stickstoff abgekühlt. Dies geschah wegen eines Rezeptorverlustes beim Erwärmen über 4°C (44,45).

5.6. Markierung des Rezeptors

Zur quantitativen Markierung des Rezeptors wird (17α-methyl-^{3}H)-Methyltrienolon (R 1881) benützt. Es besteht aber auch die Möglichkeit mit ^{3}H-DHT zu markieren. Dabei müsste man folgende Nachteile in Kauf nehmen.

1. DHT wird nicht nur vom Rezeptor, sondern auch von SHBG mit großer Affinität gebunden. (Dies ist allerdings bei Versuchen mit Rattenprostaten nicht von Bedeutung)

2. DHT kann zum Teil während der Inkubation zu 5α-Androstandiolen hydriert werden, welches vom Rezeptor nicht mehr gebunden werden kann.

Diese Nachteile hat R 1881 nicht. Es wird aber von Progestin-Rezeptoren gebunden. Da diese Rezeptoren in Rattenprostaten nicht enthalten sind, entfällt auch dieser Nachteil.

5.7. Inkubationszeit und -temperatur

Aufgrund der von Moeller (44) gefundenen Daten wurden folgende Inkubationszeiten gewählt: eine und achtundvierzig Stunden zur Bestimmung des schnell bzw. langsam markierbaren Anteils des Rezeptors. Die Inkubationstemperatur

lag grundsätzlich bei 0 - 4°C. Bei höheren Temperaturen war ein Rezeptorverlust zu verzeichnen.

5.8. Abtrennung des markierten Rezeptors

Der mit radioaktivem Material markierte Rezeptor muß von ungebundenen oder unspezifisch gebundenen Liganden abgetrennt werden. Dies ist notwendig, damit die Radioaktivität des spezifisch gebundenen Liganden mit höchstmöglicher Genauigkeit gemessen werden kann.

Für die Abtrennung gibt es verschiedene Methoden, die in den folgenden Unterkapiteln dargestellt werden.

5.8.1. Abtrennung mit Aktivkohle

Wird das Inkubationsgemisch mit Aktivkohle behandelt, so wird der ungebundene Ligand schnell adsorbiert, während der unspezifisch gebundene und rezeptorgebundene langsamer adsorbiert werden. Milgrom und Baulieu (42) haben dieses Trennprinzip eingeführt. Die Trennung zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung ist nicht scharf. Der Obergang zwischen der schnellen und langsamen Adsorptionsphase ist fließend, so daß die optimale Adsorptionszeit für jedes System ermittelt werden muß.

5.8.2. Fällung mit Ammonsulfat

Durch die Fraktionierung mit Ammonsulfat wird der markierte Rezeptor gefällt, der ungebundene bzw. unspezifisch gebundene Ligand bleibt dagegen zum größten Teil in der Lösung. Mainwaring und Irving (39) konnten die Ausbeute an meßbarem Rezeptor von 89 % auf 100 % (bei 30 %iger Sättigung mit Ammonsulfat) durch einen Oberschuß an unmarkierten, freien Liganden erhöhen. Menon u.a. (41) konnten nur eine Ausbeute

von 28 % bei 33 % Sättigung nachweisen. Wie Pousette u.a. (49) berichten, fallen 59 % des fällbaren markierten Rezeptors in der Fraktion von 20 - 40 % Sättigung.

5.8.3. Zentrifugation im Dichtegradienten

Unspezifisch bindende Proteine und SHBG sedimentieren im Bereich von 3 - 5 S, so daß 8 S-Rezeptoren ohne weiteres von ihnen abgetrennt werden können. Ebenso können freie Liganden leicht von proteingebundenen separiert werden. Daraus folgt aber auch, daß 3 - 5 S-Rezeptoren nur schwer abgetrennt werden können.

Oblich sind Glycerin-Gradienten (4,52) und Saccharose-Gradienten, denen nach Høisaeter (25) 10 % Glycerin zugesetzt werden sollte, da dadurch der 8 S-Rezeptor stabilisiert werden kann (11,15,17,18,41,50,66).

5.8.4. Gelfiltration

Anwendung finden vor allem Dextrangele unterschiedlichen Vernetzungsgrades und Sephadex LH 20. Da bei der Gelfiltration ebenso wie bei der Separierung mit dem Dichtegradienten die Molekülgröße ein wichtiges Trennkriterium ist, kann man ähnliche Trennleistungen erwarten.

Mainwaring und Irving (39) bemerken zu dieser Trennmethode, daß ein hoher Oberschuß an unmarkierten Liganden im Elutionsmittel vorhanden sein muß, um nicht eine zu niedrige Ausbeute zu erhalten.

Coffer und King (13) berichten über einen Artefakt bei der Arbeit mit Sephadex G 25 und G 75: Progesteron, Östradiol und Diäthylstilboestrol bilden bei Konzentrationen um 1 uM Aggregate, die in der Front eluiert würden. Dieses Phänomen beobachtete bei R 1881 auch Moeller (44).

In Gegenwart von unmarkierten Liganden im Bereich von 10^{-6}M können kritische Steroidkonzentrationen erreicht und falsch hohe Werte an gebundenen Liganden vorgetäuscht werden.

5.8.5. Fällung mit Protaminsulfat

Saure Proteine können mit Protaminsulfat gefällt werden. Wie Krieg u.a. (29) berichten, können nicht nur-bekannterweise- nukleäre, sondern auch cytoplasmatische östrogenbindende Proteine mit Protaminsulfat gefällt werden. Dieses Verfahren zur Separierung von markierten Rezeptoren wenden auch Davies (15), Hannouche (23), Mobbs (43) und Asselin (2) an. Menon u.a. (41) fanden allerdings heraus, daß die Ausbeute des Verfahrens nur 39 % beträgt.

5.8.6. Trennung mit Hilfe der Agarelektrophorese

Die Agarelektrophorese wurde von Wagner (61) eingeführt. Er gebraucht sie zur Charakterisierung von steroidgebundenen Proteinen im Serum und Steroidrezeptoren. Die zu untersuchende Probe trägt man in der Mitte des elektrischen Feldes auf; daraufhin wandern die an saure cytoplasmatische und nukleäre Rezeptoren gebundene Liganden in Richtung der Anode, während die ungeladenen und ungebundenen Liganden durch einen endosmotischen Pufferstrom in Richtung Kathode gespült werden. Der kathodische Peak enthält auch noch den größten Anteil der unspezifisch gebundenen Liganden. SHBG-gebundene Liganden finden sich in einem hiervon deutlich getrennten kathodischen Peak nahe dem Startloch. Die Methode eignet sich gut für die Trennung cytoplasmatischer und nukleärer Rezeptoren von SHBG, ungebundenen Liganden und einem Teil der unspezifisch gebundenen Liganden.

Die Agarelektrophorese wird von Wagner (61,63), Krieg (30,31,32,33), Wagner und Jungblut (62), Voigt und Krieg (59), Voogt und Dingjan (60) und Kummer (34) angewandt.

5.8.7. Vergleich der Methoden 5.8.1. - 5.8.6.

Soweit bekannt veröffentlichten nur Jungblut u.a. (26) einen Vergleich der verschiedenen Trennverfahren. Bei der Bestimmung von rezeptorgebundenem ^{3}H-Östradiol im Kalbsuterus und menschlichen Mammatumoren fanden sie folgende relative Ausbeutungen:

Methode	relative Ausbeute	
	Kalbsuterus	Mammatumor
Agarelektrophorese	100 %	97 %
Sephadex G 25	94 %	100 %
Aktivkohle	60 %	48 %
Dichtegradient	27 %	29 %
Protaminsulfat	10 %	23 %

nach Jungblut u.a. (26)

Für die vorgelegte Arbeit kam also nur die Agarelektrophorese und die Gelfiltration mit Sephadex G 25 für die quantitative Analyse in Frage.

Da mit R 1881 und nicht mit DHT gearbeitet wird, spielt es keine Rolle, daß bei der Agarelektrophorese der Rezeptor getrennt vom SHBG bestimmt werden kann, was bei der Gelfiltration nicht möglich ist (siehe auch 5.5.).

Da es kein Trennverfahren für die vollständige Separierung der unspezifisch gebundenen Liganden von den spezifisch gebundenen gibt, muß man noch ein weiteres Verfahren (5.8.8.) anwenden.

5.8.8. Supprimierung der spezifischen Bindung (44)

Ein weiteres Kriterium zur Unterscheidung von spezifischer und unspezifischer Bindung des markierten Liganden besteht in der Tatsache, daß die Konzentration der Rezeptorbindungsstellen klein ist ("low capacity") gegen die der unspezifischen ("high capacity"). Parallel zu dem "heißen" Inkubationsansatz macht man einen "supprimierten" Ansatz (3.3.5.1.), der außer dem markierten ^{3}H-R 1881 noch die hundertfache Menge unmarkiertes R 1881 enthält. Die Bindung des radioaktiven Liganden an den Rezeptor ist im supprimierten Ansatz auf 1 % im Vergleich zum heißen Ansatz herunterverdünnt, während die spezifische Bindung unbeeinträchtigt ist. Die Differenz, die supprimierte Bindung, wird als die spezifische Bindung des radioaktiven Liganden im heißen Ansatz angesehen.

5.8.9. Bestimmungsmethode

Der Rezeptor wird mit ^{3}H-R 1881 markiert. Die Markierung ist spezifisch, da ^{3}H-R 1881 vom Androgenrezeptor und von SHBG nur mit geringer Affinität gebunden wird. Eine störende Umwandlung, wie die des ^{3}H-DHT zu ^{3}H-Androstandiol besteht nicht, da ^{3}H-R 1881 nicht verstoffwechselt wird. Ein hundertfacher Überschuß von unmarkiertem R 1881 supprimiert in einem Parallelansatz die spezifische Bindung von ^{3}H-R 1881. Die Rezeptorkonzentration wird als die supprimierbare Bindung angegeben. Eine rechnerische Korrektur (45) verringert den systematischen Fehler bei der Berechnung der supprimierten Bindung. Bei zu geringen Mengen an zu untersuchendem Material (weniger als 200 mg) bzw. zu großen Mengen (über 800 mg) bezogen auf 2 ml Suspension treten nicht näher untersuchte Fehler auf, die keine Interpretation der gemessenen Werte zulassen.

5.9. Umrechnung der supprimierbaren Aktivität nach 1 Stunde bzw. 48 Stunden auf den freien Rezeptor bzw. Steroid-rezeptorkomplex zur Zeit der Inkubation und Supspension (45)

Oettling (45) entwickelte Formeln, mit deren Hilfe es möglich sein sollte, auf die Rezeptorkonzentration zur Zeit der Suspension und Inkubation zurückzurechnen. Diese Formeln wurden benötigt, da zwischen der Auftauzeit und dem Zeitpunkt der Inkubation ca. 100 Min. vergingen, da im sap die gleichen Reaktionskinetiken wie im Inkubat gelten, und da der Beginn dieser kinetischen Vorgänge der Zeitpunkt des Auftauens sein soll.

Die Umrechnungen wurden von mir an zwei Beispielen durchgeführt um einen Sinn und Zweck nachzuweisen.

Um einen Vergleich anstellen zu können, der die praktische Bedeutung dieser Formeln aufzeigt, wurden von den Werten der Tabellen 4.8. (Supprimierbare Aktivität nach 1 Stunde Inkubation pro 50 ul Unkubat), 4.9. (Supprimierbare Aktivität nach 48 Stunden Inkubation pro 50 ul Inkubat), 4.10. (Rezeptor zur Zeit der Suspension) und 4.11. (Rezeptor zur Zeit der Inkubation) die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Altersgruppen ermittelt. Mit den vergleichbaren Gruppen wurde dann ein t-Test durchgeführt, der folgendes Ergebnis brachte:

a) Vergleich des Wertes nach 1 Stunde Inkubation mit dem Wert des freien Rezeptors zur Zeit der Suspension:
$p = 0{,}822 \pm 0{,}086$ (1s), nur 1 x $p < 0{,}05$
--Der Wert von p gibt an, mit welcher Irrtumswahrscheinlichkeit die verglichenen Stichproben verschiedenen Grundgesamtheiten angehören.

b) Vergleich des Wertes nach 1 Stunde Inkubation mit dem Wert des freien Rezeptors zur Zeit der Inkubation:
$p = 0{,}1096 \pm 0{,}095$ (1s), 6 x $p < 0{,}05$

c) Vergleich des Wertes nach 47 Stunden Inkubation mit dem Wert des Steroidrezeptorkomplexes zur Zeit der Suspendierung:
$p = 0{,}518 \pm 0{,}095$ (1s)

d) Vergleich des Wertes nach 48 Stunden Inkubation mit dem Werte des Steroidrezeptorkomplexes zur Zeit der Inkubation:
$p = 0{,}365 \pm 0{,}081$ (1s)

Die vorliegenden Daten reichen nicht aus, um auf dem $\alpha = 0{,}05$ Signifikanzniveau einen Unterschied zwischen dem 1 Stundenwert und dem fR_o bzw. fR_s und auch nicht zwischen dem 48 Stundenwert und dem $S\text{-}R_o$ und dem $S\text{-}R_s$ festzustellen.

Einen weiteren Versuch kann man auch zwischen fR_o mit fR_s und zwischen $S\text{-}R_o$ und $S\text{-}R_s$ anstellen.

Die p-Werte beim Vergleich fR_o/fR_s lagen zwischen 0,05 und 0,8 ($\bar{x} = 0{,}1441$) und beim Vergleich $S\text{-}R_o/S\text{-}R_s$ zwischen 0,5 und 0,9 ($\bar{x} = 0{,}79$).

Auch aufgrund dieser Werte kann man zu keinem gesicherten Ergebnis gelangen; dies liegt auch in der zu großen Streuung der Werte der einzelnen Altersgruppen.

Allerdings liegt auch die Vermutung nahe, daß der freie Rezeptor und der Steroidrezeptorkomplex zwischen der Suspendierung und Inkubation nur einen geringfügigen Verlust erleiden, der sich aufgrund der sehr kleinen Werte nicht feststellen läßt.

Meiner Meinung nach bringt die Formel von Oettling für diese Arbeit keinen zusätzlichen Informationswert.

5.10. Das Wachstum der Rattenprostata während des untersuchten Zeitraumes

Während der Pubertät wächst die Rattenprostata in zwei Schüben (Abb. 2). Die schnellste relative Wachstumsgeschwindigkeit[+] (Quotient aus dem Gewicht zum Zeitpunkt t_2 und t_1) mit einer Gewichtszunahme von 128 % pro 5 Tage findet man im Altersabschnitt 20/30 d. Die relative Wachstumsgeschwindigkeit geht dann zurück, bis sie zwischen dem 40. und 45. Tag nahezu Null ist. Dann folgt ein zweiter Schub zwischen dem 50. und 55. Tag mit einer relativen Wachstumsgeschwindigkeit von ca. 50 %. Mit dem 65. Tag beginnt eine Stagnation. Diese Entwicklung in zwei Schüben beobachteten auch Bloch u.a. (8).

5.11. Zunahme von löslichem Protein im 100 000 g-Überstand und von DNA im Pellet während der Pubertät (20 - 70 Tage)

Auch bei diesen Parametern kann man eine Konzentrationszunahme in Schüben beobachten. Die größte relative Zunahme liegt hier zwischen dem 20. und 30. Tag bzw. zwischen dem 45. und 55. Tag.

Aufgrund des Quotienten DNA pro Tier/Protein pro Tier (4.7.) könnte man annehmen, daß während der ersten Wachstumsphase Hypertrophie vorherrscht und während des zweiten Schubes abwechselnd Hypertrophie und Hyperplasie zum Wachstum beitragen (siehe auch Abb. 4 und 6)

+) Als relative Wachstumsgeschwindigkeit - eine intensive Größe - wird der Faktor W bezeichnet, um den eine Größe pro Zeiteinheit zunimmt.

5.12. Konzentrationsänderung des ^{3}H-R 1881 Rezeptor-Komplexes während der Pubertät

Die Konzentration (fmol/50 ul) des 1-Stundenwertes liegt im Alter von 35 Tagen signifikant höher ($p < 0,02$) als im Alter von 30 bzw. 40 Tagen. Ein weiterer signifikanter Unterschied auf dem Niveau $p < 0,05$ liegt auch in der Altersstufe 50/60 Tage vor.

Für die 48-Stundenwerte lassen sich signifikante Unterschiede für die Altersgruppen 20/30 d ($p < 0,02$) und 30/35 d ($p < 0,01$) aufzeigen.

Statistische Aussagen im Bereich der übrigen Altersgruppen in Bezug auf Zu- oder Abnahme der Konzentration des Rezeptorkomplexes lassen sich nicht machen.

Signifikante Unterschiede bestehen auch in folgenden Kapiteln:

a) "Supprimierbare Bindung je mg Protein" (4.12.)
   - beim 1-Stundenwert der Altersgruppe 30/35 d, 35/40 d, 55/60 d, 60/65 d.
   - beim 48-Stundenwert der Altersgruppe 30/35

b) "Supprimierbare Bindung pro Tier (mol/Tier)" (4.13.)
   - beim 1-Stundenwert der Altersgruppen 30/35 d, 45/50 d, 50/55 d und 55/60 d.
   - beim 48-Stundenwert der Altersgruppen 30/35 d, 45/50 d und 50/55 d.

c) "^{3}H-R 1881 Bindung pro DNA (mol/mg)" (4.14.)
   - beim 1-Stundenwert der Altersgruppen 30/35 d und 55/60 d.
   - beim 48-Stundenwert der Altersgruppen 20/30 d und 30/35 d.

d) "fmol ^{3}H-R 1881 pro mg Prostata" (4.16.)
   - beim 1-Stundenwert der Altersgruppen 30/35 d, 35/40 d und 55/60 d.
   - beim 48-Stundenwert der Altersgruppen 20/30 d, 30/35 d 45/50 d und 50/55 d.

Diese aufgeführten Werte zeigen also vor allem Veränderungen in den Zeitabschnitten 30/35 d und 45/55 d.

Mates (40) findet im Bereich der Altersgruppe 30/35 d einen peak an Testosteronmengen und -Konzentrationen. Die von Mates bestimmten Größen (DHT und Testosteron) laufen parallel den von mir gefundenen komplementären Größen bis zum Alter von 45 Tagen.

Gupta u.a. (21) finden im Serum von nichtkastrierten Ratten Werte von Testosteron und DHT, die mit den von mit gefundenden Minima und Maxima nicht korrelieren.

6. ZUSAMMENFASSUNG

6.1. In den ventralen Prostatalappen von 20 - 70 d alten Ratten wurden im Abstand von 5 d die Konzentrationen des cytoplasmatischen Androgenrezeptors, der DNA und des löslichen Proteins im 100 000 g-Überstand (sap) gemessen und das Prostatagewicht zu diesen Zeitpunkten bestimmt.

6.2. Den Androgenrezeptor markiert man zur quantitativen Bestimmung mit ^{3}H-Methyltrienolon (^{3}H-R 1881). Der sap wird mit 2 x 10^{-8} mol/l ^{3}H-R 1881 bei 0 - 4°C inkubiert. Durch die Agarelektrophorese nach Wagner wird bei 2°C nicht spezifisch gebundenes ^{3}H-R 1881 abgetrennt. Die Radioaktivität des ^{3}H-R 1881-Rezeptorkomplexes wird gemessen. Durch einen Parallelansatz supprimiert man die spezifische Bindung von ^{3}H-R 1881 an den Rezeptor mit 2 x 10^{-6} mol/l R1881. Die Konzentration der supprimierten Bindung ist die der Bindungsstellen.

6.3. Wachstumsschübe bei der Prostata (P), der DNA-Konzentration (D) und der Proteinkonzentration (PK) findet man in folgenden Altersabschnitten: a) 20/30 d: P von 10,4 mg auf 26,7 mg; D von 39,61 ug auf 78,57 ug; PK von 182,13 ug auf 504,21 ug. b) 30/35 d: P von 26,7 mg auf 35,83 mg; PK von 504,21 ug auf 906,33 ug. c) 45/50 d: P von 46,72 mg auf 69,39 mg; D von 116,91 ug auf 176,59 ug; PK von 968,58 ug auf 1708,67 ug. d) 50/55 d: P von 69,38 mg auf 104,05 mg. e) 55/60 d: P von 104,05 mg auf 130,88 mg. f) 60/65 d: P von 130,88 mg auf 175,95 mg; D von 318,89 ug auf 640,36 ug; PK von 3194,06 ug auf 5002,41 ug.
Die supprimierbare Bindung pro Tier (1h-Wert in fmol = A und 48h-Wert in fmol = B) zeigt Wachstumsschübe in folgenden Altersabschnitten:
a) 30/35 d: A von 6,84 auf 26,87 und B von 14,46 auf 42,49.
b) 45/50 d: A von 13,52 auf 24,58 und B von 34,05 auf 63,25.
c) 50/55 d: A von 24,58 auf 37,22 und B von 63,25 auf 132,58.
Die supprimierbare Bindung je mg Protein (1H-Wert in fmol = A und 48h-Wert in fmol = B) zeigt ansteigende Werte in den Altersabschnitten:
a) 30/35 d: A von 7,89 auf 14,81 und B von 14,07 auf 23,19.
b) 55/60 d: A von 6,54 auf 9,97.

Abfallende Werte findet man in den Abschnitten:

a) 35/40 d: A von 14,81 auf 7,87.

b) 60/65 d: A von 9,97 auf 7,46.

Die supprimierbare Bindung pro mg Prostata zeigt einen signifikant abfallenden Wert im Abschnitt 35/40 d beim 1h-Wert von 0,74 fmol ^{3}H-R 1881 auf 0,36 fmol ^{3}H-R 1881.

Es besteht keine Korrelation zu den in der Literatur angeführten Serumwerten.

7. ABKÜRZUNGEN

cpm	counts per minute
DHT	Dihydrotestosteron (5α-Androstan-17β-ol-3 on)
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DPM	Zerfälle pro Minute
DST	DTT-Sucrose-Tris-Puffer
DTT	DL-Dithiothreitol
fR	freier Rezeptor
fR_o	freier Rezeptor zur Zeit der Suspension
fR_s	freier Rezeptor zur Zeit der Inkubation
^{3}H-R 1881	(17α-methyl-^{3}H)-methyltrienolon
R 1881	Methyltrienolon (17β-Hydroxy-17α-methyl-oestra-4,9,11-trien-3-on)
sap	100 000 g-Oberstand ohne Fettschicht
SHBG	sexualhormonbindendes Globulin
S-R	Steroidrezeptorkomplex
$S\text{-}R_o$	Steroidrezeptorkomplex zur Zeit der Suspension
$S\text{-}R_s$	Steroidrezeptorkomplex zur Zeit der Inkubation
Sucrose	1-O-α-Glucopyranosyl-β-D-fructofuranosid
t_o	Zeitpunkt der Suspension
t_s	Zeitpunkt der Inkubation
Tris	Tris(-hydroxymethyl-)aminomethan

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Asselin, J., Labrie, F., Gourdeau, Y. Bonne, C. and Raynaud J.P.: Binding of ^{3}H-methyltrienolone (R 1881) in rat prostate and human benign prostate hypertrophy (BPH).
Steroids 28, 449-459 (1976)

2. Asselin, J., Melancon, R., Gourdeau, Y., Labrie, F., Bonne, C. and Raynaud, J.P.: Specific binding of ^{3}H-methyltrienolone to both progestin and androgen binding components in human benign prostate hypertrophy (BPH).
J. Steroids Biochem. 10, 483-486 (1979)

3. Baulieu, E.-E., Lasnitski, J. and Robel, P.: Metabolism of testoterone and actions of metabolites on prostate glands in organ culture.
Nature 219, 1115 (1968)

4. Baulieu, E.-E. and Jung, J.: A prostatic cytosol receptor.
Biochem.biophys.Res.Commun. 38, 599-606 (1970)

5. Baulieu, E.-E.: Aspects of Steroid Hormon - target cell interactions.
A.exp.med.biol. 117, 377 (1979)

6. Becker, H.: Metabolism and mode of androgens in target tissue of male rats.
Acta Andocrinol.Suppl. 159, 21 (1972)

7. Blondeau, J.P., Corpechat, C., le Grascogne, C., Baulieu, E.-E. and Robel, P.: Androgen Receptors in the Rat Ventral Prostate and Their Hormonal Control.
Vit.Horm. 33, 319-345 (1975)

8. Bloch, G.J., Masken, J., Kragt, C.L. and Ganong, W.F.: Effect of testosterone on Plasma LH in male rats of various ages. Endocrinology 94, 947-951 (1974)

9. Boesel, R.W., Klipper, R.W. and Shain, S.A.: Androgen regulation of androgen receptor content and distribution in the ventral and dorsolateral prostates of aging AXC rats. Steroids 35, 157-177 (1980)

10. Bonne, C. and Raynaud, J.-P.: Methyltrienolone, a specific ligand for cellular androgen receptors. Steroid 26, 227-232 (1975)

11. Bonne, C. and Raynaud, J.-P.: Assay of androgen binding sites by exchange with methyltrienolone (R 1881). Steroids 27, 497-507 (1976)

12. Burton, K.: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorinetic estimation of deoxyribonucleic Acid. Biochem.J. 62, 315-322 (1956)

13. Coffer, A.J. and King, R.J.B.: An artefact associated with elution of steroids affinity resins by high concentrations of ligands. J. Steroid Biochem. 11, 1547-1549 (1979)

14. Cowan, R.A., Cowan, S.K. and Grant, J.K.: Binding of methyltrienolone (R 1881) to a progesterone receptor-like component of human prostatic cytosol. J. Endocrinol. 74, 281, 191 (1977)

15. Davies, P., Thomas, Ph. and Griffith, K.: Measurement of free and occupied cytosplasmic acid nuclear androgen receptor sites in rat ventral prostate gland. J. Endocrinol. 74, 393-404 (1977)

16. Dingjan, P.G.: Steroid-hormon receptoren in human prostataweefsel. Dissertation, Leiden (1978)

17. Dubé, J.Y., Tremblay, R.R. and Chapdelaine, P.: Binding of methyltrienolone to various androgendependent and androgen-responsive tissues in four animal species. Hormone Res. 7, 333-340 (1976)

18. Dubé, J.Y., Chapdelaine, P., Tremblay, R.R., Bonne, C. and Raynaud, J.P.: Comperative binding specifity of methyltrienolone in human and rate prostate. Hormon Res. 7, 341-347 (1976)

19. Fang, S., Anderson, K.M. and Liao, S.: Receptor proteins for androgens. On the role of specific proteins in the rentention of 17β-hydroxy-5 -androstane-3-one by the rat ventral prostate in vivo and in vitro. J.biol.Chem. 244, 6584 (1969)

20. Gaubert, C.M., Tremblay, R.R. and Dubé, J.Y.: Effect of sodium molybdate on cytosolic androgen receptors in rat prostate. J.Steroids Biochem. 13, 931-937 (1980)

21. Gupta, D., Rager, K., Zarzycki, J. and Eichner, M.: Levels of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, testosterone and dihydrotestosterone in the circulation of sexually maturing intact male rats and after orchidectomy and experimental bilateral cryptorchidism. J.Endocr. 66, 183-193 (1975)

22. Gustafsson, J.-A., Akman, P., Pousette, A., Snochowski, M. and Högberg, B.: Demonstration of a progestin receptor in human benign prostaic hyperplasia and prostatic carcinoma. Invest.Urol. 15, 361-366 (1978)

23. Hannouche, N., Thieulant, M.-L., Samperez, S. and Jonan, P.: Androgens binding proteins in the cytosol from prepubertal male rat hypothalamus, preoptic area and brain cortex. J. Steroid Biochem. 9, 147-151 (1978)

24. Hiipakka, R.A. and Liao, S.: Effect of pyridoxal phosphate on the androgen receptor from rat prostate: inhibition of receptor aggregation and receptor binding to nuclei and to DNA-cellulose. J. Steroid Biochem. 13, 841-846 (1980)

25. Høisaeter,P.A.: The androgen cytosol receptor in the ventral prostate of the rat. Methodological problems. Biochem.Biophys.Acta 317, 492 (1973)

26. Jungblut, P.W., Hughes, A., Gaues, J., Kallweit, E., Maschler, J., Parl, F., Sierralte, W., Szendro, P.J. and Wagner, R.K.: Mechanism involved in the regulation of steroid receptor levels. J.Steroid Biochem. 11, 273-278 (1979)

27. Jungblut, P.W., Gaues, J., Görlich, L., Hughes, A., Kallweit, E., Kielhorn, J., Little, M., Maschler, I., Mc Cann, S., Parl, F., Rosenfeld, G.C., Sierralta, W., Stone, G., Szendro, P.J., Teran, C., Truitt, A.J. and Wagner, R.K.: Intracellular actions of Gonadal Steroids (in Vorbereitung)

28. Karlson, P.: Hormonrezeptoren und Hormonwirkung. Klin.Wschr. 57, 607-612 (1979)

29. King, R.J.B., Gordon, J. and Steggles, A.W.: The properities of a nuclear acidic protein fraction that binds (6.7.-^{3}H)-oestradiol-17β. Biochem.J. 114, 649-657 (1969)

30. Krieg, M., Szalay, R. and Voigt, K.D.: Binding and metabolism of testosterone and of 5α-dihydrotestosterone in bulbo cavernosus / levator ani of male rats: in vivo and in vitro studies. J.Steroid Biochem. 5, 453-459 (1974)

31. Krieg, M., Bartsch, W., Herzer, S., Becker, H. and Voigt, K.D.: Quantification of androgen binding, androgen tissue levels, and sex hormone binding globulin in prostate, muscle and plasma of patients with benign prostatic hypertrophy. Acta Endocrinol. 86, 200-215 (1977)

32. Krieg, M. and Arning, C.: Quantitative determination of the binding capacity of the sex hormone-binding globulin, using agar gel electrophoresis. J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 16, 429-434 (1978)

33. Krieg, M., Grote, J., Voigt, K.D., Altenähr, E. and Klosterhalfen, H.: Human prostatic carcinoma: significant differences in its androgen binding and metabolism compared to the human benign prostatic hypertrophy. Acta Endocrinol. 88, 397-407 (1978)

34. Kummer, D.: Steroid receptor determination by means of agar gel electrophoresis. Recent Results in Cancer Research 71, 14-15 (1980)

35. Liao, S., Liang, T. and Tymozko, J.L.: Structural recognitions in the interactions of androgens and receptor proteins and in their association with nuclear acceptor components. J.Steroids Biochem. 3, 401-408 (1972)

36. Liao, S., Liang, T., Fang, S., Castaneda, E., and Shao, T.C.: Steroid structure and androgenic activity. Specificties involved in the receptor binding and nuclear retention of various androgens. J.biol.Chem. 248, 6154 (1973)

37. Mainwaring, W.J.P.: A soluble androgen receptor in the cytoplasm of rat prostate.
J.Endocrinol. 45, 531 (1969)

38. Mainwaring, W.J.P.: The mechanism of action of androgens.
Springer: New York - Heidelberg - Berlin, 1977

39. Mainwaring, W.J.R. and Irving, R.: The use of desoxyribonucleic acid-cellulose chromatography and isoeletric focusing for the characterization and partial purification of steroid-receptor complexes.
Biochem.J. 134, 113-127 (1973)

40. Mates, G.: Dissertation, Tübingen (in Vorbereitung)

41. Menon, M., Tananis, C.E., Hicks, L.L., Hawkins, E.F., Mc Loughlin, M.G. and Walsh, P.C.: Characterization of the binding of a potent synthetic androgen, methyltrienolone, to human tissue.
J.Cli.Invest. 61, 150-162 (1978)

42. Milgrom, E. and Baulieu, E.E.: A method for studying binding proteins, based upon differential dissociation of small ligand.
Biochem.Biophys.Acta 194, 602-605 (1969)

43. Mobbs, B.G., Johnson, J.E., Cunnolly, J.G. and Clark, A.F.: Androgen receptor assay in human benign and malignant prostatic tumor cytosol using protamine sulphate precipitation.
J.Steroid Biochem. 7, 289-301 (1978)

44. Moeller, H.: Bestimmung von Androgenrezeptoren durch Bindung von ^{3}H-Dihydrotestosteron in Gegenwart von NAD^{+}-Nukleosidase.
(Habilitationsschrift, Tübingen),1981

45. Oettling, G.: Dissertation, Tübingen (in Vorbereitung)

46. Oettling, G., Moeller, H. und Gupta, D.: Zur Kinetik der Reaktion des DHT-Rezeptors in vitro.
(in Vorbereitung)

47. O'Malley, B.W. and Schrader, W.T.: The receptors of steroid hormons.
Scientific American 234, 32 (1976)

48. Pietras, R.J. and Szego, C.M.: Estrogen receptors in uterine plasma membrane.
J.Steroid Biochem. 11, 1471-1483 (1979)

49. Pousette, A., Snochowski, M., Bression, D., Högberg, B. and Gustafsson, J.-A.: Partial characterization of ^{3}H-methyltrienolone binding in rat prostate cytosol.
Biochem.Biophys. Acta 582, 358-367 (1979)

50. Rajfer, J., Namkung, P.C. and Petra, Ph.H.: Identification, partial characterization and agerelated changes of a cytoplasmic androgen receptor in the rat penis.
J.Steroid.Biochem. 13, 1489-1492 (1980)

51. Raynaud, J.-P., Bouton, M.-M. and Ojasoo, T.: Design of anti-hormones.
Biochem.Soc.Trans. 7, 547-551 (1979)

52. Rosen, V., Jung, J., Baulieu, E.-E. and Robel, P.: Androgen-binding proteins in human benign prostatic hypertrophy.
J.Clin.Endocrinol.Metabol. 41, 761-770 (1975)

53. Schaffner, W. and Weissmann, C.: A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution.
Anal.Biochem. 56, 502-514 (1973)

54. Shain, S.A., Boesel, R.W., Lamm, D.L. and Radwin, H.M.: Characterization of unoccupied androgen binding components of the hyperplastic human prostate.
Steroids 31, 541-556 (1978)

55. Snochowski, M., Pousette, A., Ekman, P., Bression, D., Andersson, L., Högberg, B. and Gustafsson, J.-A.: Characterization and measurement of the androgen receptor in human benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma.
J.Clin.Endocrinol.Metab. 45, 920-930 (1977)

56. Sullivan, J.N. and Strott, C.A.: Evidence for an androgen-independent mechanism regulating the levels of receptor in target tissue.
J.biol.Chem. 248, 3202-3208 (1973)

57. Unhjem, O. and Tveter, K.J.: Localization of an androgen binding substance from the rat ventral prostate.
Acta Endocrin. (Kbh.) 60, 571-578 (1969)

58. Velluz, L., Nomine, G., Bucourt, R. and Mathieu, J.: Un analogue trienque de la methyltestosterone.
C.R.Acad.Sci. 257, 569-570 (1963)

59. Voigt, K.-D. and Krieg, M.: Biochemical endocrinology of prostatic tumors. In: Current topics in experimental endocrinology (eds.: Martini, L. and James, V.H.T.)
Academic Press, New York, Vol. III, p. 173-199 (1978)

60. de Voogt, H.J. and Dingjan, P.: Steroid receptor in human prostatic cancer. A preliminary evaluation.
Urol.Res. 6, 151-158 (1978)

61. Wagner, R.K.: Characterization and assay of steroid hormone receptors and steroid binding serum proteins by agar gel electrophoresis at low temperature.
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 353, 1235-1245 (1972)

62. Wagner, R.K. and Jungblut, P.W.: Oestradiol- and dihydrotestosterone receptors in normal and neoplasic human mammary tissue.
Acta Endocrinol. 82, 105-120 (1976)

63. Wagner, R.K.: Extracellular and intracellular steroid binding proteins.
Acta Endocrinol. Suppl. 218 (1978)

64. Wagner, R.K. and Gaues, J.: Arbeitsanleitung für Steroid-Rezeptor-bestimmung in menschlichen Mammacarcinomen.
(Institutsinterne Arbeitsanleitung des Max-Planck-Institutes für Zellbiologie, Wilhelmshaven)

65. Williams-Ashman, H.G.: Biochemical features of androgen action.
Advanc.Biosci. 2, 200-221 (1968)

66. Wright, F., Kirchhoffner, M.-O. and Mauvais-Jarvais, P.: Antagonist action of dihydroprogesterone on the formation of the specific dihydrotestosterone-cytoplasmatic receptor complex in rat ventral prostate.
J.Steroid Biochem. 10, 419-422

Ich danke dem Direktor der Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik von Hormon- und Stoffwechselstörungen an der Universitätskinderklinik Tübingen (Ärztl. Direktor Prof. Dr. J. Bierich) Herrn Prof. Dr. D. Gupta für die Überlassung eines Arbeitsplatzes.
Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dipl. Biochem. H. Moeller danke ich für die Überlassung des Themas sowie ganz besonders dafür, daß er jederzeit zur Verfügung stand, um anstehende Probleme zu klären. Dies tat er in einer Atmosphäre, die freundschaftlich und herzlich war, so daß die Arbeit an dieser Dissertation nie unangenehm wurde.
Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. H.-J. Gerth (Abt. für med. Virologie am Hygiene-Institut der Universität Tübingen), der mir für diese Arbeit eine Ultrazentrifuge seines Labors zur Verfügung stellte.
Ebenso möchte ich mich bei dem Geschäftsführenden Direktor der Universitätsfrauenklinik, Herrn Prof. Dr. H. Hirsch,für die Möglichkeit der Benutzung eines ß-Zählers bedanken.
Mein weiterer Dank gilt Frl. Dagmar Schumacher,CTA, und Herrn G. Oettling, Arzt, die mir während des experimentellen Arbeitens einige nützliche Tips gegeben haben.
Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei meiner Frau bedanken, die mir bei der Erstellung der Diagramme und Tabellen sehr geholfen hat.

LEBENSLAUF

Am 3. Oktober 1950 wurde ich, Klaus Lander, als 2. Kind des Konditormeisters Werner Lander und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Pfaff, in Göppingen geboren.

Die Grundschule besuchte ich von 1957 bis 1961 in Göppingen und von 1961 bis 1968 den neusprachlichen Zug des Freihofgymnasiums in Göppingen. 1968 wechselte ich an das altsprachliche Collegium Ambrosianum in Stuttgart-Bad Cannstatt, wo ich am 5. Oktober 1971 mein Abitur bestand.

Im WS 1971 und SS 1972 studierte ich an der Universität Tübingen Theologie, Soziologie und Geschichte. Danach studierte ich Chemie an der Universität Tübingen und Ulm von WS 1972 bis WS 1975. Anschließend arbeitete ich von März 1976 bis Oktober 1977 als Praktikant im Kreiskrankenhaus Göppingen. Im WS 1977 konnte ich mit dem Medizinstudium an der MNH Ulm beginnen und bestand dort im WS 1978 das Physikum. Zum SS 1979 wechselte ich an die Universität Tübingen und bestand im SS 1980 den 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.

Seit 1981 bin ich mit Frau Gabriele Lander, geb. Bock, verheiratet.

Den 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung bestand ich im WS 1981. Das Praktische Jahr habe ich im April 1982 mit dem Ausbildungsabschnitt «Chirurgie» an der Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen (Ärztl. Direktor: Professor Dr. L. Koslowski) begonnen.

Den 3. Teil der Ärztlichen Prüfung habe ich am 18. April 1983 abgelegt.